

**Die Wirkung von ALS und Thymektomie  
auf die chronische Sekundärkrankheit  
bei Mäusen**

Joachim Werner

1972







AUS DEM INSTITUT FÜR HÄMATOLOGIE  
DER GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN - UND UMWELTFORSCHUNG  
NEUHERBERG  
DIREKTOR: PROF.DR.W.STICH

DIE WIRKUNG VON A L S UND THYMEKTOMIE AUF DIE CHRONISCHE  
SEKUNDÄRKRANKHEIT BEI MÄUSEN

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von  
Joachim Werner  
aus St. Blasien / Schwarzwald  
München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
München

Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.S.THIERFELDER

Mitberichterstatter: Prof.Dr.W.Brendel

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1972



# I n h a l t s v e r z e i c h n i s

|                                                              | Seite |
|--------------------------------------------------------------|-------|
| Einleitung                                                   | 2     |
| Methodik                                                     | 6     |
| Versuchstiere                                                |       |
| Antilymphocytenserum                                         |       |
| Thymektomie                                                  |       |
| Hauttransplantation                                          |       |
| Bestrahlung und Knochenmarktransplantation                   |       |
| Endogene Milzkolonien                                        |       |
| Blutbild                                                     |       |
| Ergebnisse                                                   | 11    |
| Hauttransplantation                                          | 11    |
| Lymphocytenzahlen                                            | 13    |
| Endogene Milztransplantation                                 | 14    |
| Knochenmarktransplantation                                   | 16    |
| Thymektomierte Empfänger                                     | 19    |
| Spender: unbehandelt                                         |       |
| ALS                                                          |       |
| ALS und Thymektomie                                          |       |
| Nichtthymektomierte Empfänger                                | 27    |
| Spender: thymektomiert                                       |       |
| unbehandelt                                                  |       |
| ALS                                                          |       |
| ALS und Thymektomie                                          |       |
| Diskussion                                                   | 34    |
| Immunkompetente Zellen im Knochenmark                        | 34    |
| Allgemeine Immunsuppression der Knochenmarkspender           | 38    |
| Besprechung der Versuche mit Empfängerthymektomie            | 43    |
| Besprechung der Versuche mit nichtthymektomierten Empfängern | 48    |
| Zusammenfassung                                              | 53    |
| Literaturverzeichnis                                         | 55    |



## Einleitung

Die Transplantation hämopoetischer Zellen wurde erstmals im Jahre 1949 von der Gruppe um Jacobson (1) vorgenommen und von Lorenz et al. (2) 1951 weitergeführt. Die Autoren bewahrten letal bestrahlte Mäuse vor dem Strahlentod, indem sie den bestrahlten Tieren empfängereigene (autologe) Milz- oder Knochenmarkzellen übertrugen. Diese Versuche bildeten den Anlaß für eine Vielzahl von Untersuchungen, deren Ergebnisse die Entwicklung der Organtransplantation und der Transplantationsimmunologie maßgeblich beeinflussten. Das Gebiet der Zelltransplantation befindet sich größtenteils noch im Stadium der experimentellen Versuche. Hierfür ist nicht so sehr die Transplantationstechnik verantwortlich, sondern die immunologisch bedingten Schwierigkeiten, die sich aus der Zellübertragung ergeben.

Knochenmark und Milz werden nicht als kompaktes Organ, sondern als Zellsuspension übertragen. Der für die Spenderzellen benötigte Proliferationsraum wird meistens durch eine letale Ganzkörperbestrahlung geschaffen. Bis zu einer Strahlendosis von 1200 r werden hauptsächlich die hämopoetischen Organe betroffen, da blutbildende Zellen zu den strahlenempfindlichsten Geweben des Organismus zählen. Erst bei einer höheren Dosis werden andere Gewebe und Organe geschädigt (3).

Ein wichtiger Unterschied zur Organtransplantation besteht in der Verteilung der immunologischen Aktivitäten. Organe wie die Niere oder die Haut enthalten nur eine geringe Zahl immunkompetenter Zellen. Dagegen beherbergen die blutbildenden Organe eine Vielzahl immunreaktiver Zellen. Die Transplantation der Zellen auf einen letal bestrahlten, genetisch differenten und gewebsunverträglichen Empfänger führt zu einer immunologischen Reaktion der Spenderzellen gegen die Gewebsantigene des Empfängers. An den Folgen der hieraus resultierenden Sekundärkrankheit gehen die Tiere zu Grunde. Diese "Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion" ist bei einer Organtransplantation nicht möglich. Hier wird das fremde Organ von immunkompetenten Empfängerzellen abgestoßen, die bei der Knochenmarktransplantation durch Immunsuppression ausgeschaltet werden müssen, um ein Anwachsen der Fremdzellen zu ermöglichen.

Zwei Verlaufsformen der Sekundärkrankheit werden unterschieden. Nach Milzzellgabe tritt die akute Sekundärkrankheit ein; die Knochenmarkübertragung ist von der chronischen Form der Erkrankung gefolgt. Der Verlauf der Se-

kundärkrankheit wird weiterhin vom Grad der genetisch bedingten Gewebsunterschiede zwischen Spender und Empfänger bestimmt. Je größer die Gewebsunverträglichkeit ist, um so heftiger läuft die Sekundärkrankheit ab. Das gilt vor allem für die allogene Zelltransplantation, wobei Spender und Empfänger der gleichen Spezies angehören (z.B. Maus auf Maus). Die Verhinderung der immunologisch bedingten Sekundärkrankheit ist das Ziel vieler Untersuchungen. Dabei ergeben sich verschiedene Ansatzmöglichkeiten für eine immunsuppressive Therapie.

1. Empfängerbehandlung: Die Bildung und Reaktionsfähigkeit immunkompetenter Spenderzellen im Empfängertier soll durch eine immunsuppressive Behandlung verhindert werden. Verwendung finden Methotrexat, Endoxan (4) sowie Antilymphocytenserum (5,4).
2. In vitro Vorbehandlung der Spenderzellen: Neben der immunsuppressiven Behandlung mit Antilymphocytenserum (ALS) oder Anti-IgG-Seren (6), ist die Methode von Dicke und van Bekkum zu nennen, mit der durch Separation der Immunzellen von den Stammzellen und Transplantation der letzteren die Sekundärkrankheit verhindert werden soll (7).
3. Spendervorbehandlung in vivo: Durch Elimination und Inaktivierung der immunkompetenten Spenderzellen mit immunsuppressiven Mitteln soll das Auftreten der Sekundärkrankheit verzögert oder vermieden werden. Ledney et al. (8) sowie Thierfelder et al. (9) verwendeten Antilymphocytenserum. Sie führten ihre Experimente an ingezüchteten Mäusen durch, womit eine genaue Differenzierung der genetisch bedingten Gewebsunterschiede zwischen Spender und Empfänger gewährleistet wurde.

Die immunsuppressive Wirkung von ALS ist schon lange bekannt. Woodruff und Anderson (10) zeigten 1963, daß Ratten nach Behandlung mit ALS allogene Hauttransplantate verzögert abstießen. Ledney und van Bekkum (11) konnten nach ALS Spenderbehandlung die Sekundärkrankheit im semiallogenen System (parentale Knochenmarkzellen auf  $F_1$  Empfängertiere) völlig ausschalten. In einem sehr starken, allogenen System konnten Thierfelder et al. (9) durch Spenderbehandlung mit ALS das Auftreten der Sekundärkrankheit verzögern.

Antilymphocytenserum wirkt vor allem auf immunkompetente, kleine Lymphocyten. In Versuchen von Monaco et al. (12) konnte gezeigt werden, daß diese Lymphocyten thymusabhängig sind. Thymektomie verstärkte die Wirkung von ALS auf die Verlängerung der Überlebenszeit allogener Haut erheblich. Die Bedeutung des Thymus für die Genese und Aufrechterhaltung des immunologischen Apparates auch bei erwachsenen Tieren wurde von Miller (13,14) aufgezeigt. Neonatal thymektomierte Mäuse waren in ihrer immunologischen Abwehrlage sehr

geschwächt und starben innerhalb weniger Monate (13). Thymektomierte, syngene Knochenmarkschimären (letal bestrahlte Empfängerermäuse, denen Knochenmark des gleichen, ingezüchteten Stammes übertragen wurde, was der Transplantation zwischen eineiigen Zwillingen entspricht) zeigten, verglichen zu nichtthymektomierten Kontrolltieren, abgeschwächte Immunreaktionen gegen zelluläre Antigene wie z.B. allogene Haut (14). In allogenen, thymektomierten Knochenmarkschimären ließ sich die Sekundärkrankheit jedoch nicht verhindern (15).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, inwieweit durch die Thymektomie des Spenders die immunsuppressive Wirkung von ALS auf das Knochenmark verstärkt werden kann, und ob die Thymektomie des Empfängers zu einer zusätzlichen Verminderung der immunologischen Reaktion zwischen Spenderknochenmark und Empfängerorganismus führt.

In Vorversuchen sollte die immunsuppressive Wirkung von ALS und Thymektomie auf die in dem starken, allogenen Versuchssystem verwendeten Mäuse des C57BL/6 und CBA Stammes untersucht werden. Als Gradmesser für die erzielte Immunsuppression dienten das verlängerte Tragen allogener Hauttransplantate sowie die Verringerung der absoluten Lymphocytenzahl im peripheren Blut. Der Einfluß von ALS und Thymektomie auf die Stammzellpopulationen wurde durch Bestimmung der Anzahl von Kolonie-bildenden-Einheiten auf der Milzoberfläche von subletal bestrahlten Mäusen ermittelt.

Die Transplantation von verschieden vorbehandeltem, allogenen Spenderknochenmark auf lethal bestrahlte, thymektomierte Empfänger sollte den Einfluß des Empfängerthymus auf die Genese der Sekundärkrankheit verdeutlichen. Um die, von der Spendervorbehandlung abhängige, verschiedenstarke Immunschwächung des Empfängers und die sich daraus ergebenden Symptome von einer Sekundärkrankheit abgrenzen zu können, wurden syngene Kontrollgruppen mitgeführt. Anschließend sollte das Auftreten der Sekundärkrankheit nach Knochenmarktransplantation von thymektomierten, ALS behandelten Spendern auf nichtthymektomierte Empfänger untersucht werden, um einen möglichen Unterschied zur alleinigen ALS-Behandlung aufzuzeigen. Dabei sollte die Bedeutung des Empfängerthymus für die Toleranzinduktion gegen empfängereigene Antigene berücksichtigt werden. Das immunologische Verhalten der Knochenmarkschimären gegenüber allogener Haut wurde ebenfalls geprüft.

Die gezielte Steuerung oder Vermeidung der Sekundärkrankheit hätte für die klinische Anwendung der Knochenmarktransplantation große Bedeutung. Die Behandlung therapiebedingter Knochenmarkaplasien z.B. nach Cytostaticaanwen-

dung, aber auch die Behandlung von Aplasien anderer Genese wäre durch Übertragung hämopoetischer Zellen ermöglicht. Auch in der Therapie von Leukosen wäre die Knochenmarktransplantation einzusetzen. Ein großes Anwendungsgebiet liegt vor allem in der Organtransplantation. Hier läßt sich durch eine Knochenmarktransplantation am sichersten eine Toleranz des Empfängerorganismus gegen fremde Organe erzielen.

## Methoden und Materialien

### I Versuchstiere

Hoch ingezüchtete Versuchstiere der Mäusestämme CBA/J, A/J und C57BL/6J wurden verwendet. Alle Mäuse wurden von den Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA, bezogen. Der C57BL/6J Stamm wird im weiteren Verlauf vereinfacht CBL genannt. Transplantiert wurde zwischen gleichgeschlechtlichen Tieren. Die Mäuse hatten zum Zeitpunkt der Knochenmarktransplantation ein Körpergewicht von 25 - 30 g und waren 12 Wochen alt. In keinem Fall betrug die Zahl der in einem Makrolon-Käfig Typ II gehaltenen Tiere mehr als 12. Alle Mäuse erhielten Sniff-Mäusefutter (Altromin). Dem Trinkwasser wurde Streptomycin in der Konzentration von 1:25000 hinzugefügt.

Kaninchen wurden von einem örtlichen Händler geliefert.

### II Herstellung eines heterologen Antilymphocytenserums

Für alle Versuche wurde ein Kaninchen-anti-Maus-Lymphocytenserum verwendet (im folgenden ALS abgekürzt). Dieses Serum wurde nach einer von Gray et al. (16) angegebenen Methode hergestellt, jedoch ohne Verwendung von Freund'schen Adjuvans.

12 Wochen alte Kaninchen wurden mit Lymphknotenzellen des CBL Mäusestammes immunisiert. Die Lymphknotenzellen wurden aus den submandibulären, axillären, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten gewonnen. Um die Zellausbeute zu verbessern, erhielten die CBL Mäuse eine Woche vorher jeweils  $10^6$  Lymphknotenzellen einer im gleichen Stamm im Tierstall des Haematologischen Instituts spontan aufgetretenen lymphatischen Leukämie injiziert. Bei der Erstimmunisation wurden den Kaninchen  $10^8$  Lymphknotenzellen (in physiologischer Kochsalzlösung suspensiert) über die Ohrvene injiziert. Nach 3 Wochen wurde 3 Tage hintereinander mit je  $10^8$  Lymphknotenzellen geboostert. 3 Tage nach der letzten Zellgabe wurden jedem Kaninchen 80 ml Blut über die Ohrvene entnommen. Nach weiteren 4 Tagen wurden die Tiere entblutet. Nach dem Absetzen des Blutkuchens (bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde das überstehende Serum mit einer Pipette abgehoben und zweimal 10 Minuten lang mit 4000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Auf diese Weise wurde die Kontamination mit zellulären Bestandteilen vermieden. Zur Sterilisierung wurde das Serum mit Na-Merthiolat in der Konzentration von 1:10000 (1 Tropfen auf 5 ml Serum) versetzt. Da die Serummenge eines Kaninchens relativ gering ist, wurden die Seren von jeweils 6 Kaninchen gepoolt. Das Serum wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 1. Testung des Antilymphocytenserums

Vor der Verwendung eines ALS Pools wurde das Serum a) auf seine Lymphocytotoxicität, b) auf seine Toxicität, c) auf seine Immunsuppression getestet.

ad a) Die Lymphocytotoxicität kann man mit einem Komplementbindungstest bestimmen. Ein antilymphocytäres Serum verbraucht bei seiner Reaktion mit Testlymphocyten Komplement. Mit sensibilisierten Hammelerythrocyten läßt sich der jeweilige Komplementschwund nachweisen. Die auf diese Art bestimmten Titergrößen bewegten sich bei den verwendeten ALS Pools zwischen 1:256 und 1:2048.

ad b) Die Toxicität der Seren wurde geprüft, indem 6 CBL Mäusen 4 Tage lang täglich je 0,25 ml ALS intraperitoneal gespritzt wurde. Starben während des Behandlungszeitraumes Tiere unter toxisch allergischen Reaktionen, so wurde das Serum nicht verwendet.

ad c) Die immunsuppressive Wirkung eines ALS Pools wurde an Hand einer zellulären Immunreaktion, der Abstoßung eines fremden Hauttransplantates, getestet. Nach 6-tägiger ALS Behandlung (tgl. 0,25 ml i.p.) wurde den CBL Mäusen am 7. Tag ein allogenes Hautstück einer CBA Maus transplantiert. Ergab sich ein deutlicher Unterschied in der Transplantatabstoßung zwischen dieser Gruppe und einer nicht vorbehandelten Kontrollgruppe, so galt das ALS als immunsuppressiv.

### 2. Applikation des Antilymphocytenserums

In allen Versuchen erhielten die Mäuse 6 Tage lang täglich 0,25 ml ALS intraperitoneal injiziert. Am 7. Tag erfolgte die jeweilig weitere Behandlung.

### III Durchführung der Thymektomie

Ein nach Miller (17) modifiziertes Verfahren wurde entwickelt. Die Thymektomie wurde immer an 9 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden mit Na-Evipan betäubt und in Rückenlage fixiert. Der Nacken wurde hyperextendiert und etwas angehoben. Unter aseptischen Bedingungen wurde in der Medianlinie ein etwa 1,5 cm langer Hautschnitt ausgeführt, der von der oberen Halsregion bis zum kaudalen Ende des Sternums reichte. Mit 4-0 Mersilene Faden (Ethikon, Hamburg) wurde um den Schnitt herum eine Tabaksbeutelnaht gelegt. Anschließend wurden die bei Mäusen sehr stark entwickelten glandulae submaxillares nach kranial abgehoben. Durch 2 jeweils lateral der Medianlinie liegende Schrägschnitte wurde das Sternum bis in Höhe des 3. Rippen-

ansatzes gespalten und eine keilförmige Eröffnung des Mediastinums geschaffen. Die prätracheale Faszie, welche nach kaudal beide Thymuslappen umschließt und an die Pleura mediastinalis sowie an das mediastinale Perikard angrenzt, wurde von kranial nach kaudal eröffnet. Die Thymusregion war nun freipariert. Ein sich zur Ansaugöffnung hin verjüngendes Glasröhrchen wurde in das Mediastinum eingeführt. Durch dosiertes Saugen mit dem Munde wurde der linke Thymuslappen anluxiert, mit Hilfe einer Pinzette von seinen bindegewebigen Verbindungen gelöst und abgesaugt. Auf die gleiche Weise wurde der rechte Lappen entfernt.

Bei dieser Operation galt es, zwei Komplikationen zu vermeiden:

- a) Bildung eines Pneumothorax,
- b) die Verletzung der vena cava superior.

ad a) Durch die enge topographische Beziehung der Thymuslappen zu der Pleura parietalis kam es fast bei jeder Thymektomie zu einer Plauraverletzung. Der resultierende Pneumothorax konnte an den verlängerten Atemzügen oder an der beginnenden Schnappatmung erkannt werden. Durch sofortiges Abdichten der Operationsöffnung mittels der glandulae submaxillares und durch Zuziehen der Tabaksbeutelnaht konnte der Pneumothorax in fast allen Fällen beherrscht werden.

ad b) Eine schwerwiegende Komplikation bestand in der Verletzung der vena cava superior durch zu starken Sog. Der schweren Blutung erlagen alle betroffenen Tiere.

Die Operationsmortalität lag zwischen 5 % und 10 %.

#### Nachweis einer vollständigen Thymusentfernung

- a) Histologisch: Am Ende eines Versuches wurden die thymektomierten Tiere getötet. Das Mediastinum wurde makroskopisch untersucht und vollständig entnommen. Die Thymusregion wurde in 9 Stufenschnitten histologisch kontrolliert. Unvollständig thymektomierte Tiere wurden aus dem Versuch genommen.
- b) Funktionell in Kombination mit ALS: Hauttransplantate eines allogenen Spenders wurden länger toleriert (siehe Ergebnisse). Die peripheren Lymphocyten waren stärker vermindert (siehe Ergebnisse).

#### IV Hauttransplantation

Transplantiert wurde allogene Haut. Als Spender und Empfänger dienten CBA/J, CBL/J und A/J Mäuse.

Spenderrückenhaut wurde auf den Rücken einer Empfängermaus transplantiert.

Nach entsprechender Vorbereitung des Spendertieres - Narkose, Abscheren und Säuberung des Hautbereichs - wurden mit einer Drillstanze kreisrunde Hautstücke (Durchmesser 12 mm) gewonnen. Das subcutane Gewebe wurde sorgfältig abpräpariert, das Hautstück in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt.

Das Transplantatbett des Empfängers wurde durch vorsichtiges Abtrennen der Haut vom subcutanen Gewebe vorbereitet. Auftretende Blutungen durch Verletzung der Subcutis wurden mit 0,9 % NaCl Lösung gestillt.

Beim Einlegen des Transplantates wurden die Wundränder genau zur Deckung gebracht. Mit einer antibakteriellen Gaze (Cura-Tüll, Lohmann) wurde das Hautstück auf seiner Umgebung fixiert. Ein zirkulärer Pflasterverband garantierte ein gutes Einwachsen des Transplantates.

#### Kontrolle des Transplantates

Je nach Art der Vorbehandlung wurde das Transplantat am 12. oder 14. Tag erstmalig inspiziert. Bis zum 21. Tag erfolgte die Kontrolle in 2-tägigem Abstand, danach zweimal pro Woche. Der Verband wurde bis zum 21. Tag nach jeder Inspektion erneuert.

Ein Hauttransplantat galt als abgestoßen, wenn es nur noch in 10 % seiner ursprünglichen Größe erhalten war oder wenn es ganz blutunterlaufen war. Als Kriterien einer beginnenden Transplantatabstoßung dienten Haarausfall, entzündete Stellen mit Nekrosenbildung und Zusammenziehung des Transplantates.

#### V Knochenmarktransplantation

In allogenen und syngen Systemen wurde transplantiert. Unter aseptischen Bedingungen wurden dem Spendertier Femur und Tibia beider Extremitäten entnommen. Die Epiphysen wurden abgeschnitten, die Diaphysen mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Die in einer Petrischale aufgefangenen Knochenmarkteilchen wurden zerkleinert und 10 Minuten mit 2000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Das Zellkonzentrat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,6 ml verdünnt. Jedes Tier erhielt 24 Stunden nach Bestrahlung 0,3 ml des Zellkonzentrates (entspricht einem halben Knochenmark) über die Schwanzvene injiziert.

#### VI Bestrahlung

Die Knochenmarkempfänger wurden mit einer Strahlendosis von 900 r letal vorbehandelt.

Bis zu 18 Mäusen konnten in einer kreisrunden Kunststofftrommel gleichzeitig

bestrahlt werden. Als Strahlenquelle diente ein  $^{137}\text{Caesium}$  Gerät (Siemens, Typ Caesa Gammatron, 7 KCi). Die Trommel war von der Strahlenquelle 70 cm entfernt. Die Strahlendosis betrug 60r/Min.

#### VII Endogene Milzkolonien

Die Methode wurde nach Porteous und Lajtha (18) sowie Till und McCulloch (19) modifiziert. CBL Mäuse wurden mit einer Dosis von 650r oder 750r bestrahlt und am 10. Tag nach Bestrahlung getötet. Die Milz wurde entnommen und für 24 Stunden in Bouin'scher Lösung fixiert. Die Bouin'sche Lösung wurde immer neu angesetzt (3 Teile wässrige Pikrinsäure, 1 Teil Formol und 1/5 Teil Eisessig). Die durch Stammzellteilung hervorgerufenen, makroskopisch sichtbaren Knoten an der Milzoberfläche wurden gezählt.

#### VIII Blutausstriche und Blutzellzählung

Das Blut wurde mit einem Hämatokritröhrchen aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Die Leukocyten wurden in einer Neubauerkammer ausgezählt.

Die Blutausstriche wurden mit Wright-Eosin-Methylenblau angefärbt. Jeweils 100 Zellen wurden differenziert und die absoluten Lymphocytenwerte bestimmt.

#### IX Histologie

Alle Organe und Gewebestücke wurden in 10 % Formalinlösung fixiert, die Schnitte mit Haemalaun-Eosin angefärbt.

#### X Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Blutzellwerte wurden mit der mittleren Standardabweichung aufgeführt. Die statistische Auswertung der Knochenmarktransplantationsversuche erfolgte nach dem U-Test von Wilcoxon; Mann und Whitney (20). Für diese Methode wurde bei den überlebenden Tieren der 100. Tag als Todestag eingesetzt, da die Mäuse nach diesem Zeitpunkt anderen Untersuchungen unterzogen wurden, was natürlich eine Einschränkung der Aussagekraft dieser Methode bedeutet.

## Ergebnisse

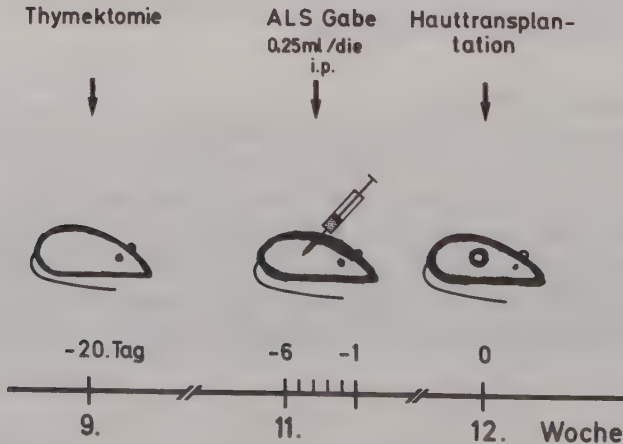
### I. Der Einfluß von ALS und Thymektomie auf die Abstoßung allogener Hauttransplantate bei CBL und CBA Mäusen

Die zelluläre Immunreaktion gegen H-2 inkompatible Organtransplantate ist thymusabhängig. Antilymphocytenserum wirkt vor allem auf die kleinen Lymphocyten, welche thymusabhängig sind und bewirkt dadurch eine Verzögerung und Schwächung der Hautabstoßung (= Empfänger-gegen-Transplantat-Reaktion).

Monaco et al. (12) zeigten, daß Thymektomie in Kombination mit einer ALS Behandlung zu einem sehr viel längeren Überleben eines allogenen Hautstücks führte, als nach einer alleinigen ALS Behandlung. Die Autoren verwendeten ein H-2 inkompatibles, allogenenes System, in welchem CBL/J Mäuse als Spender und A/J Mäuse als Empfänger dienten.

Der Einfluß von Thymektomie und ALS auf die Mäusestämme CBL und CBA wurde untersucht. Die Behandlung der Hautempfänger erfolgte nach folgendem Schema: Thymektomie in der 9. Woche, 14 tägiges Intervall, danach 6 Tage ALS Behandlung (s. Schema 1). Beide Mäusestämme unterscheiden sich in ihren H-2 Loci und sind stark histoinkompatibel.

### HAUTTRANSPLANTATION



Schema 1

# 1. Transplantation von CBA Haut auf CBL Mäuse (s. Tabelle 1)

Unvorbehandelte CBL Mäuse stießen ein CBA Hauttransplantat zwischen dem 8. und 13. Tag ab (mittlere Überlebenszeit =  $10,45 \pm 1,51$  Tage; n = 11). Eine 6tägige ALS Behandlung verzögerte die Abstoßungszeit um etwa 1 Woche. Nach zusätzlicher Thymektomie wurden die Hautstücke zwischen dem 26. und 90. Tag abgestoßen, die meisten zwischen dem 30. und 50. Tag. Einige Tiere, die das Transplantat zwischen dem 30. und 40. Tag abgestoßen hatten, wurden histologisch untersucht. In den periarteriolen Zonen der Milzfollikel waren die thymusabhängigen Lymphocyten selektiv vermindert und durch Retikulumzellen ersetzt. Die immunkompetenten Lymphocyten in den regionären Lymphknoten waren nach ALS und Thymektomie nicht vollständig eliminiert und konnten somit eine lokale Immunreaktion einleiten.

ALS und Thymektomie verlängerten die Überlebenszeit von CBA Hauttransplantaten. Die Hauttransplantate wurden jedoch zu einem Zeitpunkt abgestoßen, an dem die immunkompetenten, thymusabhängigen Zellen in der Milz selektiv vermindert waren.

| Empfänger |            | Haut-spender | Überlebenszeit in Tagen |     |       |       |       |       |       |       |        |         |      | mittl. Überlebenszeit u. Standardabweichung in Tagen |
|-----------|------------|--------------|-------------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|------|------------------------------------------------------|
|           | Behandlung |              | n                       | ≤14 | 15-21 | 22-30 | 31-40 | 41-50 | 51-60 | 61-80 | 81-100 | 101-150 | ≥151 |                                                      |
| CBL       |            | CBA          | 6                       | 6   |       |       |       |       |       |       |        |         |      | $10,45 \pm 1,51$                                     |
| CBL       |            | CBA          | 5                       | 5   |       |       |       |       |       |       |        |         |      |                                                      |
| CBL       | ALS        | CBA          | 8                       |     | 6     | 2     |       |       |       |       |        |         |      | $18,50 \pm 2,51$                                     |
| CBL       | ALS        | CBA          | 6                       |     | 6     |       |       |       |       |       |        |         |      | $17,83 \pm 1,94$                                     |
| CBL       | ALS        | CBA          | 4                       |     | 4     |       |       |       |       |       |        |         |      | $18,00 \pm 0,32$                                     |
| CBL       | thym + ALS | CBA          | 4                       |     |       | 1     | 1     | 1     | 1     |       |        |         |      | $39,50 \pm 12,79$                                    |
| CBL       | thym + ALS | CBA          | 13                      |     |       | 1     | 4     | 3     | 2     | 2     | 1      |         |      | $48,23 \pm 18,37$                                    |
| CBL       | thym + ALS | CBA          | 6                       |     |       | 1     | 4     | 1     |       |       |        |         |      | $35,33 \pm 6,65$                                     |
| CBL       | thym + ALS | CBA          | 6                       |     |       | 2     | 4     |       |       |       |        |         |      | $31,67 \pm 5,50$                                     |
| CBA       |            | CBL          | 8                       | 5   | 3     |       |       |       |       |       |        |         |      | $12,88 \pm 2,70$                                     |
| CBA       | ALS        | CBL          | 5                       |     |       |       | 2     | 3     |       |       |        |         |      | $41,20 \pm 6,80$                                     |
| CBA       | ALS        | CBL          | 6                       |     |       | 1     | 3     | 2     |       |       |        |         |      | $38,33 \pm 7,53$                                     |
| CBA       | ALS        | CBL          | 10                      |     |       | 3     | 4     | 2     | 1     |       |        |         |      | $37,80 \pm 9,15$                                     |
| CBA       | thym + ALS | CBL          | 9                       |     |       |       |       |       |       | 2     | 2      | 1       | 4    |                                                      |
| CBA       | thym + ALS | CBL          | 8                       |     |       |       |       |       |       |       |        | 2       | 6    |                                                      |
| CBA       | thym + ALS | CBL          | 10                      |     |       |       |       |       |       |       |        | 2       | 8    |                                                      |
| CBA       | thym + ALS | CBL          | 9                       |     |       |       |       |       |       |       | 3      | 2       | 4    |                                                      |
| CBA       | thym + ALS | CBL          | 10                      |     |       |       |       |       |       |       | 2      | 4       | 6    |                                                      |

Tabelle 1: Überlebenszeiten allogener Hauttransplantate auf unbehandelten, ALS behandelten, sowie thymektomierten und ALS behandelten Empfängertieren.

## 2. Hauttransplantation auf CBA Mäuse (s. Tabelle 1)

Unbehandelte CBA Tiere stießen CBL Haut zwischen dem 9. und 16. Tag ab (MÜZ =  $12,88 \pm 2,70$  Tage). Nach ALS Behandlung wurden die Transplantate zwischen dem 25. und 30. Tag abgestoßen. Die Abstoßung bis zur Nekrose des Transplantates verlief langsamer als bei unbehandelten Tieren.

ALS und Thymektomie führte bei allen CBA Mäusen zu einem hervorragenden Einwachsen des Transplantates mit vollem, kräftigem Haarwuchs. Nur wenige Mäuse stießen die Haut bis zum 100. Tag ab. Weit über die Hälfte der CBA Tiere trug die Haut länger als 150 Tage, einige tragen das Hauttransplantat bereits über 1 Jahr. Auch bei diesen Mäusen hat das Transplantat seine ursprüngliche Größe und üppigen Haarwuchs beibehalten.

Während die CBL Mäuse ihre normale Immunitätslage nach mehreren Wochen wieder erlangten, führte die Behandlung mit ALS und Thymektomie bei CBA Tieren zu einer viele Monate andauernden Immunsuppression.

## II. Der Einfluß von Thymektomie und ALS auf das weiße Blutbild bei CBL und CBA Mäusen

Auf Grund seiner Lymphocytotoxizität hat ALS eine lymphopenische Wirkung auf das weiße Blutbild, die etwa 4 Wochen anhält. Nach Monaco et al. (12) führt eine zusätzliche Thymektomie zu einer Lymphopenie, die dreimal solange andauert wie nach alleiniger ALS Gabe.

Nach üblicher Vorbehandlung (s. Schema 1) wurde am 1. und 30. Tag nach Beendigung der ALS Behandlung die absolute Lymphocytenzahl im peripheren Blut bestimmt.

### 1. Ergebnisse bei CBL Mäusen

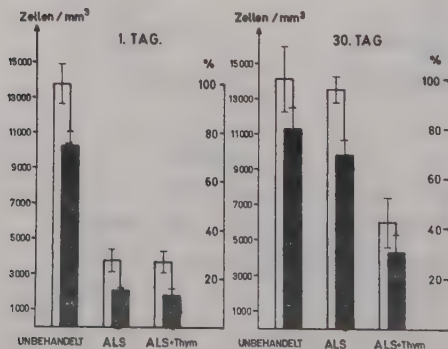


Abb. 1

Leukocyten- (□) und Lymphocytenwerte (■) im peripheren Blut von jeweils 4 CBL Mäusen am 1. und 30. Tag nach ALS oder ALS und Thymektomie Vorbehandlung. Zum Vergleich die Zellzahlen einer unbehandelten Gruppe.

Nach ALS Behandlung fielen die absoluten Lymphocytenwerte von etwa  $10000/\text{mm}^3$  auf  $2000/\text{mm}^3$  ab (s. Abb. 1). Nach 30 Tagen lagen die Lymphocytenzahlen wieder im Normalbereich. Nach Thymektomie und ALS Behandlung bestand am 1. Tag gegenüber der ALS Gruppe kein Unterschied in den absoluten Lymphocytenwerten. Am 30. Tag war die Lymphocytenzahl jedoch noch stark erniedrigt. Sie lag um die Hälfte niedriger als in der ALS Gruppe ( $4300/\text{mm}^3$ :  $9700/\text{mm}^3$ ).

## 2. Ergebnisse bei CBA Mäusen

Bei den CBA Tieren (s. Abb. 2) lagen die Lymphocytenwerte am 1. Tag in der unbehandelten Gruppe bei  $6900/\text{mm}^3$ , in der ALS Gruppe bei  $800/\text{mm}^3$  und in der Thymektomie und ALS Gruppe bei  $500/\text{mm}^3$ . Zwischen beiden letzteren Gruppen bestand kein Unterschied. Am 30. Tag zeigten die unbehandelte Gruppe und die ALS Gruppe die gleiche Anzahl von  $4500$  Lymphocyten  $/\text{mm}^3$  im peripheren Blut. Die ALS behandelte, thymektomierte Gruppe wies dagegen nur Lymphocytenwerte von  $1700/\text{mm}^3$  auf.

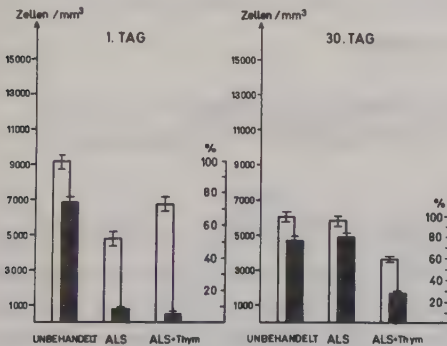


Abb. 2

Leukocyten- (□) und Lymphocytenwerte (■) im peripheren Blut von jeweils 4 CBA Mäusen am 1. und 30. Tag nach ALS oder ALS und Thymektomie Vorbehandlung. Zum Vergleich die Zellzahlen einer unbehandelten Gruppe.

Die Ergebnisse von Monaco konnten in den Systemen CBL und CBA voll bestätigt werden. Thymektomie kombiniert mit ALS vermindert die Lymphocytenzahl länger als ALS alleine.

## III. Endogene Milzkoloniebildung bei CBL Mäusen

Der Einfluß von Thymektomie und ALS auf die Stammzellpopulationen der CBL Mäuse wurde untersucht. In dem verwendeten Versuchsmodell wurde die Anzahl von Kolonie-bildenden-Einheiten (Colony-Forming-Unit  $\hat{=}$  CFU) auf der Milzoberfläche bestimmt. Über den Stammzellgehalt des Knochenmarks allein konnte mit dieser Methode keine Auskunft gegeben werden, sondern nur über den Gesamtgehalt an Milzkolonie-bildenden Zellen einer Maus.

|                     | BESTRAHLUNG |                                   |       |                                   |
|---------------------|-------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|
|                     | 650 r       |                                   | 750 r |                                   |
|                     | Tiere       | Milzkolonien                      | Tiere | Milzkolonien                      |
| unbehandelt         | 12          | 0,0,0,1,1,<br>2,3,5,5,<br>6,6,11, | 8     | 0,0,1,1,<br>1,1,<br>2,3,          |
| ALS                 | 13          | 24,25,28,30,<br>32,33,36,<br>6 K  | 8     | 19,22,24,<br>25,25,27,<br>28, 1 K |
| ALS und Thymektomie | 13          | 23,28,35,<br>10 K                 | 8     | 10,13,19,22,<br>23,24,26,27,      |

K = Kolonien konfluerten wegen ihrer Vielzahl

Abb. 3 Endogene Milzkolonien bei CBL Mäusen nach Behandlung mit ALS oder ALS und Thymektomie. Zum Vergleich eine unbehandelte Gruppe.

Verschieden vorbehandelte CBL Tiere wurden einer Strahlendosis von 650 r oder 750 r ausgesetzt (s. Abb. 3). Nach 10 Tagen wurden die Tiere getötet und die CFU auf der Milzoberfläche ausgezählt. Bei unbehandelten CBL Mäusen konnten nach 650 r nur wenige Kolonien gezählt werden (zwischen 0 und 6, bei einer Maus 11). Eine 6 tägige ALS Behandlung unmittelbar vor der Bestrahlung führte bei den CBL Tieren zu einem starken Anstieg der hämopoetischen Stammzellen in der Milz. Die Milzen waren erheblich größer als die von unbehandelten Tieren und wiesen eine Vielzahl von Kolonien auf. Einige Milzen waren von konfluierenden Kolonien dermaßen übersät, daß sie nicht ausgezählt werden konnten. Die Erhöhung der Strahlendosis auf 750 r bewirkte gegenüber 650 r eine geringe Verminderung der CFU. Zwischen der ALS Gruppe und den Mäusen, die thymektomiert und ALS behandelt waren, bestand kein Unterschied in Art und Zahl der CFU.

Die Erhöhung der Strahlendosis, die für eine feinere Differenzierung zwischen beiden Gruppen notwendig gewesen wäre, konnte nicht durchgeführt werden, da die Tiere nach einer Dosis von über 800 r vor Beendigung des Versuches an den Folgen der Strahlenschäden starben.

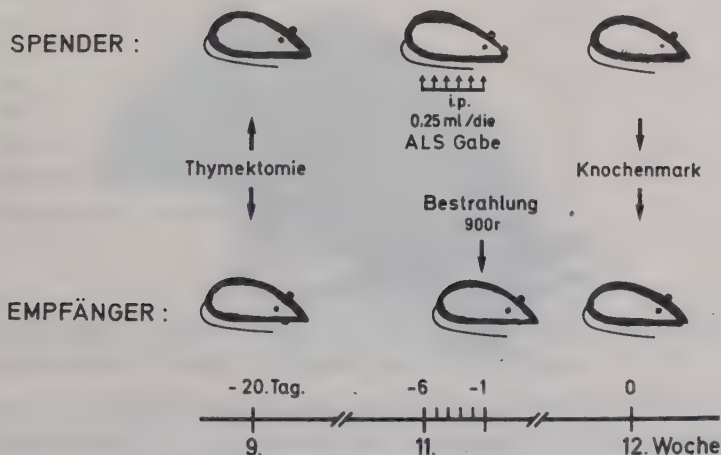
#### IV. Knochenmarktransplantation

Die Knochenmarkübertragungen wurden im allogenen, H-2 inkompatiblen CBL → CBA System durchgeführt. Dabei dienten die CBL Mäuse als Spender, Mäuse des CBA Stammes als Empfänger. Die Knochenmarkspender waren zum Zeitpunkt der Transplantation 12 Wochen alt. Das Alter der Empfänger schwankte zwischen 12 und 14 Wochen.

In einer Versuchsreihe erfolgte die Vorbehandlung verschiedener Gruppen gleichzeitig. Das Knochenmark der Spender wurde immer am gleichen Tag transplantiert (s. Schema 2).

In syngenem Kontrollgruppen wurde CBA Knochenmark auf CBA Empfänger übertragen.

#### KNOCHENMARKTRANSPLANTATION



Schema 2

Die letal vorbestrahlten Empfängertiere erhielten jeweils die Zellen eines  $1/2$  Knochenmarks (ein "ganzes Knochenmark" entspricht dem Mark aus Femur und Tibia beider Extremitäten eines Tieres) gespritzt. Die Auszählung der kernhaltigen Knochenmarkzellen von CBL Mäusen ergab, daß das Knochenmark, unabhängig von der Art der Vorbehandlung, annähernd gleich viele Zellen enthielt. (Unbehandeltes Knochenmark:  $63,57 \cdot 10^6 \pm 11,15 \cdot 10^6$  Zellen,  $n = 7$ ; ALS vorbehandeltes Knochenmark:  $66,64 \cdot 10^6 \pm 16,96 \cdot 10^6$  Zellen,  $n = 7$ ; ALS und Thyrektomie Spendervorbehandlung:  $65,93 \cdot 10^6 \pm 11,84 \cdot 10^6$  Zellen,  $n = 7$ ).

Ein halbes Knochenmark enthielt immer zwischen  $25 \cdot 10^6$  und  $35 \cdot 10^6$  kernhaltige Zellen.

#### Auftreten und Charakteristik der chronischen Sekundärkrankheit

Die Transplantation von H-2 inkompatiblen Knochenmark, etwa im allogenen System, führt zu einer immunologischen Reaktion der Spenderzellen gegen den letal bestrahlten Empfängerorganismus. Diese Spender-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion  $\hat{=}$  GvH-Reaktion) bedingt das Auftreten der Sekundärkrankheit nach dem 20. Tag. Im Gegensatz zu dieser chronischen Sekundärkrankheit kommt es nach einer inkompatiblen Milzzelltransplantation zu einer akuten Sekundärkrankheit, die innerhalb weniger Tage nach der Zellübertragung zum Tode führt (21).



Abb. 4 Maus mit chronischer Sekundärkrankheit

| Versuch        | Spender u. Empfänger u. |               | n  | überlebenszeit in Tagen |       |       |       |        |    | überlebende Tiere |  | mittl. Überlebenszeit u. Standardabweichung in Tagen |
|----------------|-------------------------|---------------|----|-------------------------|-------|-------|-------|--------|----|-------------------|--|------------------------------------------------------|
|                | Vorbehandlung           | Vorbehandlung |    | 1-20                    | 21-40 | 41-60 | 61-80 | 81-100 | n  | %                 |  |                                                      |
| A - D          |                         | CBA           | 22 | 22                      |       |       |       |        |    |                   |  | 11,36 ± 3,65                                         |
| A <sub>1</sub> | CBL                     | CBA           | 18 | 2                       | 5     | 4     | 1     |        | 6  | 33                |  |                                                      |
| B <sub>1</sub> | CBL                     | CBA           | 18 |                         | 4     | 9     | 5     |        |    |                   |  | 50,33 ± 12,76                                        |
| C <sub>1</sub> | CBL                     | CBA           | 16 | 1                       | 8     | 7     |       |        |    |                   |  | 35,60 ± 8,81                                         |
| D <sub>1</sub> | CBL                     | CBA           | 16 |                         | 2     | 9     | 3     |        | 2  | 12,5              |  |                                                      |
| A <sub>2</sub> | CBL                     | ALS CBA       | 18 | 2                       | 2     | 3     | 1     | 3      | 7  | 38,8              |  |                                                      |
| B <sub>2</sub> | CBL                     | ALS CBA       | 19 | 1                       | 3     | 4     | 2     | 3      | 5  | 27,7              |  |                                                      |
| D <sub>2</sub> | CBL                     | ALS CBA       | 15 |                         | 3     | 3     | 4     | 2      | 3  | 20                |  |                                                      |
| A <sub>3</sub> | CBL thym + ALS          | CBA           | 24 | 1                       |       | 2     | 1     | 2      | 18 | 75                |  |                                                      |
| B <sub>3</sub> | CBL thym + ALS          | CBA           | 20 | 1                       | 3     | 3     | 2     | 2      | 9  | 45                |  |                                                      |
| D <sub>3</sub> | CBL thym + ALS          | CBA           | 10 |                         | 3     |       |       |        | 7  | 70                |  |                                                      |
| A <sub>4</sub> | CBL thym                | CBA           | 24 | 1                       | 9     | 5     | 3     | 3      | 3  | 12,5              |  |                                                      |
| B <sub>4</sub> | CBL thym                | CBA           | 18 |                         | 6     | 7     | 2     |        | 2  | 11,1              |  |                                                      |
| C <sub>2</sub> | CBL thym                | CBA           | 14 | 2                       | 10    | 2     |       |        |    |                   |  | 31,93 ± 16,78                                        |
| A <sub>5</sub> | CBL                     | CBA thym      | 26 | 1                       | 7     | 17    | 1     |        |    |                   |  | 45,17 ± 8,34                                         |
| B <sub>5</sub> | CBL                     | CBA thym      | 22 | 1                       | 5     | 6     | 4     | 3      | 3  | 13,6              |  |                                                      |
| A <sub>6</sub> | CBL                     | ALS CBA thym  | 24 |                         | 1     | 5     | 6     | 2      | 10 | 41,6              |  |                                                      |
| A <sub>7</sub> | CBL thym + ALS          | CBA thym      | 25 | 12                      | 7     | 2     | 2     |        | 2  | 8                 |  |                                                      |
| C <sub>3</sub> | CBL thym +2·ALS         | CBA thym      | 28 | 14                      | 13    | 1     |       |        |    |                   |  | 21,14 ± 7,31                                         |
| A <sub>8</sub> | CBA                     | CBA thym      | 6  |                         |       |       |       |        | 6  | 100               |  |                                                      |
| D <sub>4</sub> | CBA                     | CBA thym      | 8  |                         | 1     | 1     |       |        | 6  | 75                |  |                                                      |
| A <sub>9</sub> | CBA thym + ALS          | CBA thym      | 26 | 4                       | 7     | 2     |       |        | 13 | 50                |  |                                                      |
| D <sub>5</sub> | CBA thym + ALS          | CBA thym      | 6  |                         | 3     |       |       |        | 3  | 50                |  |                                                      |
| C <sub>4</sub> | CBA thym +2·ALS         | CBA thym      | 18 | 2                       |       | 11    | 4     |        | 1  | 5,5               |  |                                                      |

Tabelle 2: Transplantation von Knochenmark im syngenem und allogenen System mit verschiedener Spender- und Empfängervorbehandlung.

Erläuterung: Versuchsgruppen mit dem gleichen Buchstaben gehören der gleichen Versuchsreihe an und können deshalb gut untereinander verglichen werden.

Das klinische Erscheinungsbild der chronischen Sekundärkrankheit ist gekennzeichnet von starker Diarrhoe. Unter rapider Gewichtsabnahme kommen die Tiere innerhalb einiger Tage bis Wochen ad exitum. Die chronische Diarrhoe führt zu einer Verkrustung und Entzündung der Analregion. Die Tiere sind apathisch und nehmen eine kauende Haltung ein (s. Abb. 4). Das Fell ist struppig, vereinzelt treten Hautläsionen mit Schuppung und Haarausfall auf. Oedeme an Schwanz und Extremitäten vervollkommen das äußere Bild.

Die histologischen Kriterien der chronischen Sekundärkrankheit sind multiple Leberzellnekrosen, Atrophie der Milzfollikel, Lymphopenie, excessive Granulocytose mit starker Rechtsverschiebung (22).

Die Tiere wurden bis zum 100. Tag nach der Knochenmarktransplantation beobachtet. Der Gewichtsverlauf wurde wöchentlich kontrolliert. Einige Tiere wurden histologisch auf das Vorliegen einer Sekundärkrankheit untersucht.

#### Bestrahlungskontrollen

Bei jedem Bestrahlungsversuch wurde eine Mäusegruppe mitgeführt, die mit 900 r letal bestrahlt wurde, jedoch kein Knochenmark erhielt. Die so bestrahlten Tiere starben bis zum 20. Tag nach Bestrahlung an einem Knochenmarksyndrom (Knochenmarkaplasie, Thrombocytopenie, Leukocytopenie, Hämorrhagien und Septikämie; s. 23).

Die mittlere Überlebenszeit der Tiere lag bei  $11,36 \pm 3,65$  Tagen ( $n = 22$ ).

#### 1. Knochenmarktransplantation auf letal vorbestrahlte, thymektomierte Empfänger (s. Tabelle 2)

a) Unbehandeltes CBL Knochenmark auf thymektomierte oder normale CBA Mäuse

2 Versuchsreihen wurden durchgeführt. Es wurde untersucht, ob eine Empfänger-thymektomie zu einer Verminderung der Sekundärkrankheit gegenüber nichtthymektomierten Empfängern führt.

#### Versuch A (s. Abb. 5 und Tabelle 2: A<sub>1</sub> und A<sub>5</sub>)

In beiden Gruppen trat die Sekundärkrankheit noch vor dem 30. Tag nach Transplantation auf. Die größte Mortalität lag zwischen dem 30. und 60. Tag. Während alle Tiere der thymektomierten Gruppe unter starkem Gewichtsabfall bis zum 63. Tag an einer Sekundärkrankheit starben, überlebten 33 % der nicht-thymektomierten Tiere die 100 Tage Grenze. Zwischen beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,4247$ ).

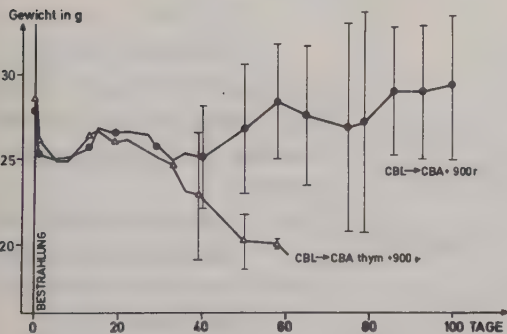
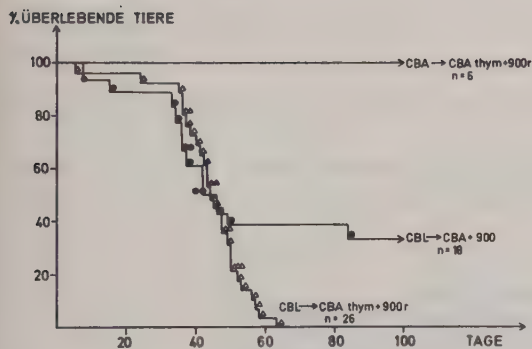


Abb. 5

Versuche A<sub>1</sub> und A<sub>5</sub>  
Transplantation von  
unbehandeltem CBL Knochen-  
mark auf thymektomierte (Δ)  
und normale (●) CBA Empfän-  
gertiere.  
Oben : Überlebenszeiten in %  
Unten: Gewichtsverlauf

### Versuch B (s. Abb. 6 und Tabelle 2: B<sub>1</sub> und B<sub>5</sub>)

Beide Gruppen verhielten sich sehr ähnlich. Die meisten Tiere starben zwischen dem 30. und 60. Tag nach der Transplantation. Bis zum 68. Tag waren alle Tiere der nichtthymektomierten Gruppe der Sekundärkrankheit erlegen. Nur 13,6 % (3 Tiere) der thymektomierten Empfänger überlebten den 100. Tag. Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant ( $p = 0,1357$ ).

### Histologische Befunde der Empfängertiere

Bei allen Tieren war kein Thymusgewebe nachweisbar. Die histologischen Befunde bestätigten das Vorliegen einer schweren Sekundärkrankheit in den Empfängertieren.

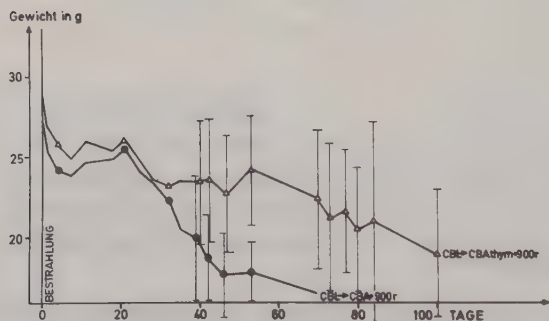
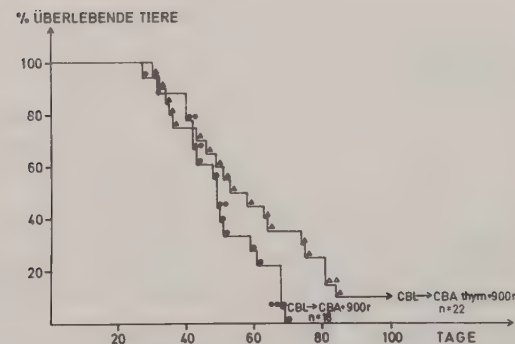


Abb. 6

Versuche B<sub>1</sub> und B<sub>5</sub>

Transplantation von unbehandeltem CBL Knochenmark auf thymektomierte (Δ) und normale (●) CBA Empfängertiere.

Oben : Überlebenszeiten der Empfängertiere in %  
Unten: Gewichtsverlauf der Empfängertiere

**Milz** : Hochgradige Atrophie der Milzfollikel mit Follikelnekrosen.

Gesteigerte, rechtsverschobene Granulopoese in der roten Milzpulpa.

**Leber** : Dichte granulocytäre, lymphocytäre Infiltrationen der Periportaltrakte mit hochgradiger Atrophie der Gallengangsepithelien. Ausgedehnte, flächenhafte Nekrosen der Leberzellen.

**Sternum** : Massiv gesteigerte, rechtsverschobene Granulopoese. Nahezu völliges Verschwinden der Erythroblasten, Gewebnekrosen.

Eine syngene Kontrollgruppe, bei der CBA Knochenmark auf thymektomierte CBA Empfänger transplantiert wurde, zeigte keine Mortalität bis zum 100. Tag. Alle Tiere entwickelten sich gut und wiesen äußerlich und gewichtsmäßig keinen Immundefizit auf (s. Tab. 2, Gruppe A<sub>8</sub>).

Die Versuche zeigten, daß die alleinige Entfernung des Empfängerthymus die Entstehung der Sekundärkrankheit in diesem System nicht verzögern und vermindern kann.

b) ALS Vorbehandlung der Spender und Transplantation von Knochenmark auf thymektomierte Empfänger

Eine 6 tägige ALS Behandlung der Spender konnte die Überlebenszeit der Empfänger deutlich verbessern (s. Abb. 7 und Tab. 2: A<sub>1</sub>, A<sub>5</sub> und A<sub>6</sub>).

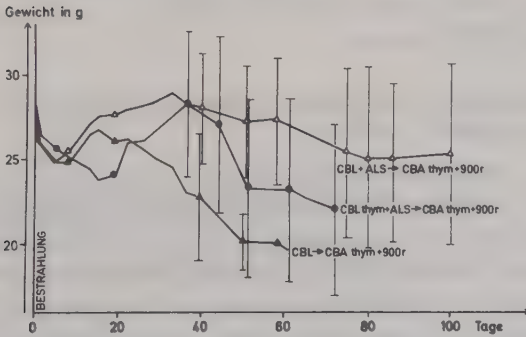
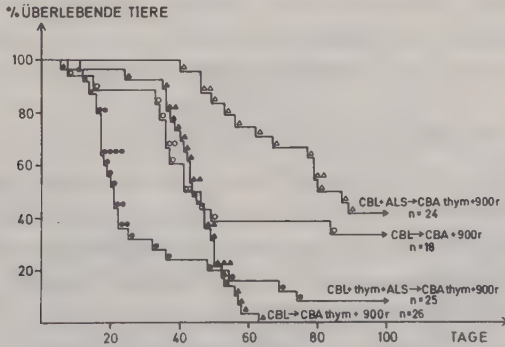


Abb. 7

Versuche A<sub>1</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub> und A<sub>7</sub>

Transplantation von unbehandeltem (▲), ALS (△) oder ALS und Thymektomie (●) behandeltem Knochenmark auf thymektomierte Empfänger. Im Vergleich unbehandeltes (○) CBL Knochenmark auf nichtthymektomierte Empfänger.

Oben : Überlebenszeit in %

Unten: Gewichtsverlauf

Verglichen mit der thymektomierten Gruppe, welche unbehandeltes Knochenmark erhalten hatte, war ein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit vorhanden ( $p < 0,0001$ ). Auch gegenüber der nichtthymektomierten Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

Die Sekundärkrankheit trat erst nach dem 40. Tag auf und verlief weniger stark. Die Hauptmortalität lag zwischen dem 60. und 80. Tag. Neben den Zeichen einer chronischen GvH-Reaktion wurde histologisch bei einigen Tieren das Vorliegen einer Virusinfektion festgestellt, die mit zum Tode führte. 10 der 24 Tiere (41,6 %) überlebten die 100 Tage Grenze, starben jedoch bis zum 180. Tag. Trotz ALS Spendervorbehandlung und Empfängerthymektomie waren die transplantierten Knochenmarkszellen in der Lage, eine chronische GvH-Reaktion einzuleiten.

#### c) Thymektomie und ALS Vorbehandlung des Knochenmarkspenders

Da die Spender-gegen-Wirt-Reaktion von Zellen des transplantierten Knochenmarks ausgeht, wurde versucht, durch eine zusätzliche Thymektomie des Spenders eine stärkere immunsuppressive Wirkung auf das Knochenmark auszuüben. Um zu unterscheiden, ob die Todesursache auf eine Sekundärkrankheit oder auf einen Mangel an immunkompetenten Zellen zurückging, wurde in diesem Versuch eine syngene Kontrollgruppe mitgeführt. Die thymektomierten Spender wurden ein- oder zweimal 6 Tage lang mit ALS behandelt. Zwischen der 1. und 2. ALS Behandlung bestand ein vierwöchiges Intervall.

#### α) Einmalige ALS Behandlung des thymektomierten Spenders (s. Abb. 7 und 8 sowie Versuche A<sub>7</sub> und A<sub>9</sub> in Tab. 2)

Allogener Versuch: Die Thymektomie des Spenders zusätzlich zu ALS führte zu einer sehr starken Verkürzung der Überlebenszeit der thymektomierten Empfänger. Die Mortalität der allogenen Empfängertiere setzte bereits am 11. Tag nach Transplantation ein und erreichte zwischen dem 15. und 30. Tag ihren Höhepunkt. Von 25 Tieren überlebten nur 2 Tiere (8 %) den 100. Tag.

Syngener Versuch: 50 % der Empfängertiere starben zwischen dem 12. und 42. Tag nach Transplantation. Der Rest der Tiere überlebte die 100 Tage Grenze. Zwischen der syngen und allogenen Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,005$ ).

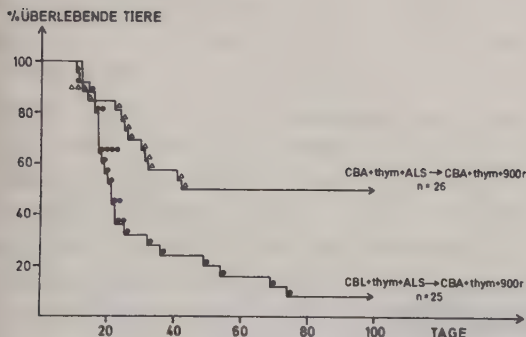
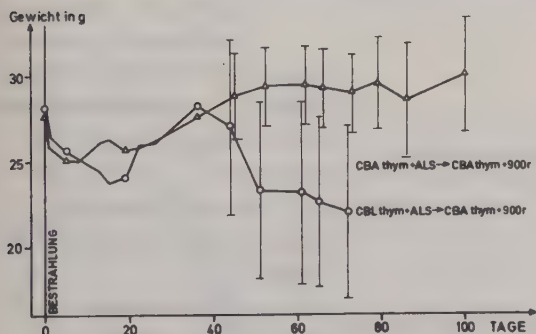


Abb. 8

Versuch A<sub>7</sub> und A<sub>8</sub>  
Knochenmarktransplantation auf thymektomierte Empfänger. Spender thymektomiert und ALS behandelt.

Vergleich zwischen einer syngen (Δ) und allogenen (●) Gruppe.

Oben : Überlebenszeit in %  
Unten: Gewichtsverlauf



β) Zweimalige ALS Behandlung des thymektomierten Spenders (s. Abb. 9 und Versuche C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> in Tab. 2)

In der allogenen Gruppe überlebte von 28 Tieren nur 1 Maus die 30 Tage Grenze.

Die Überlebenskurve der syngen Gruppe fiel ebenso steil ab, wie die der allogenen Gruppe. Sie war aber um 30 Tage verschoben. Die größte Sterblichkeit fiel auf den Zeitraum zwischen dem 44. und 60. Tag. Nur 1 Tier überlebte die 100 Tage Grenze. Auch in diesem Versuch bestand eine Signifikanz zwischen beiden Gruppen ( $p \ll 0,001$ ).

Innerhalb der syngen und allogenen Gruppen vermochte eine zweimalige ALS Behandlung die Ergebnisse nicht signifikant zu verändern (syngene Gruppen A<sub>9</sub>, C<sub>4</sub> :  $p = 0,3557$ ; allogene Gruppen A<sub>7</sub>, C<sub>3</sub> :  $p = 0,2709$ ).

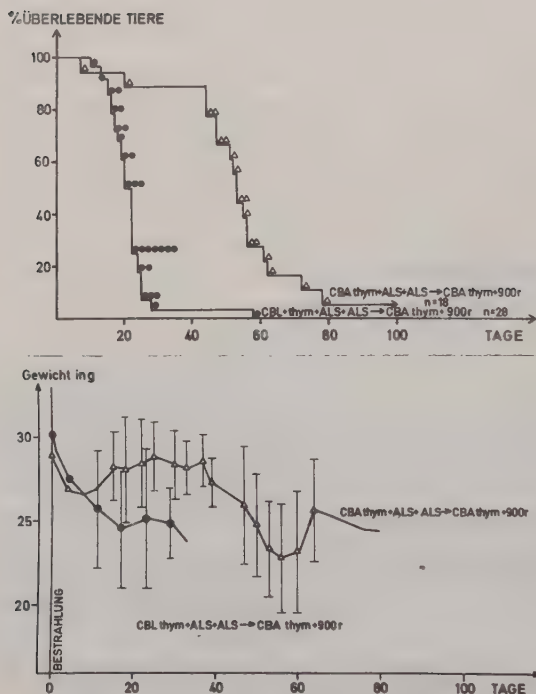


Abb. 9

Versuche C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub>  
Knochenmarkstransplantation auf thymektomierte Empfänger. Spender thymektomiert und zweimal ALS behandelt.  
Vergleich zwischen syngener (Δ) und allogener (●) Gruppe.  
Oben: Überlebenszeit in %  
Unten: Gewichtsverlauf

Da sich die histologischen Befunde der syngenen und allogenen Empfängertiere entsprachen, werden sie gemeinsam besprochen.

- Milz : Hochgradige Atrophie der Milzfollikel mit stärkster Verminderung der Lymphocyten (bis zu 80 %).
- Leber : Oft ohne Befund, in einigen Fällen starke Leberzellnekrosen.
- Sternum : Normale Zelldichte, hochgradige Steigerung der Granulopoese mit extremer Rechtsverschiebung, Verminderung der Erythroblasten und Megakaryocyten, Aplasie.
- Lymphknoten : Hochgradige Atrophie
- Lunge : Meist Bronchopneumonien
- Beurteilung : Auffällig ist die starke Verminderung des gesamten lymphatischen Gewebes. Die Veränderungen in Knochenmark und Milz zusammen mit den Lungenbefunden sprechen für eine Virusinfektion mit bakterieller Superinfektion, die auch als Todesursache in Betracht kommt. Es gibt keinen Hinweis für eine Sekundärkrankheit.

Für die verstärkte Mortalität der allogenen Tiere kann daher nicht nur der Mangel an immunkompetenten Zellen verantwortlich gemacht werden, da die Überlebenszeiten der syngenen Gruppen signifikant verlängert waren. Einzelne histologische Befunde zeigten, daß sich das allogene Knochenmark im Empfänger nur wenig ansiedelte.

In den allogenen Versuchssystemen, bei denen das Empfängertier thymektomiert war, konnte nur nach alleiniger Spendervorbehandlung mit ALS ein signifikant besseres Überleben des Empfängers erzielt werden ( $p < 0,05$ ). Unbehandeltes Spenderknochenmark führte im Empfänger zu einer starken GvH-Reaktion. Die Kombination von Thymektomie und ALS als Spendervorbehandlung resultierte in einer Mortalität, die sehr viel höher lag als in einer normalen Kontrollgruppe und auf einen allgemeinen Mangel an immunkompetenten Zellen zur Verteidigung gegen ubiquitäre Keime zurückgeführt wird (s. Diskussion).

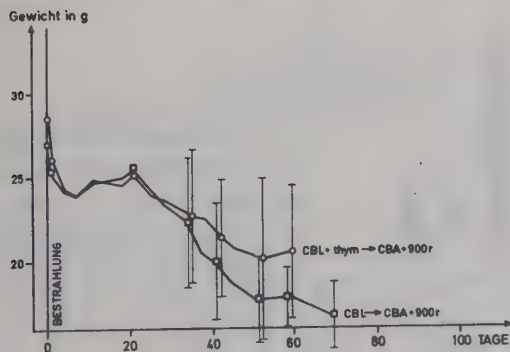
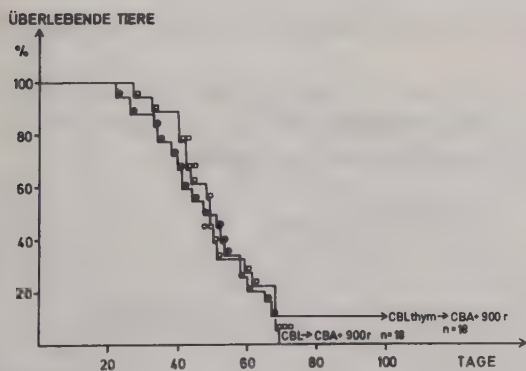


Abb. 10

Versuche B<sub>1</sub> und B<sub>4</sub>

Knochenmarktrans-

plantation von thymektomierten (●) und unbehandelten (□) Spendern auf nichtthymektomierte Empfänger.

Oben : Überlebenszeit in %

Unten: Gewichtsverlauf

## 2. Verschiedene Spendervorbehandlung und Transplantation auf nichtthymektomierte Empfänger

### a) Alleinige Spenderthymektomie (Versuche A<sub>1</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>2</sub> in Tabelle 2)

Der Thymus von CBL Mäusen wurde entfernt, das Knochenmark auf letal bestrahlte CBA Tiere übertragen. In einer Vergleichsgruppe erhielten die Empfänger unbehandeltes Knochenmark.

In Versuch B (s. Abb. 10 und Tab. 2 : B<sub>1</sub> und B<sub>4</sub>) starben alle Tiere der Vergleichsgruppe zwischen dem 22. und 69. Tag nach Transplantation unter starker Gewichtsabnahme an einer chronischen GvH-Reaktion. In der Gruppe mit Spenderthymektomie waren zwischen dem 27. und 68. Tag 16 von 18 Tieren der Sekundärkrankheit erlegen. Die beiden restlichen Tiere (11,1 %) überlebten den 100. Tag. Die große Übereinstimmung der beiden Gruppen in den Überlebenszeiten zeigte sich auch im Verlauf der Gewichtskurven.

In den Versuchen A und C konnte zwischen den Vergleichsgruppen A<sub>1</sub> und A<sub>4</sub> sowie C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden.

### b) Spendervorbehandlung mit ALS oder mit Thymektomie und ALS im Vergleich zu unbehandelten Spendern

In den Versuchen A<sub>1-3</sub>, B<sub>1-3</sub>, D<sub>1-3</sub> (s. Tab. 2) wurde die Wirkung einer Spendervorbehandlung mit ALS oder mit ALS und Thymektomie auf den Empfänger untersucht. Unbehandeltes Spenderknochenmark diente als Kontrolle.

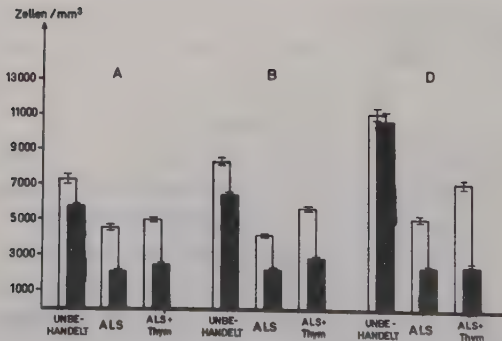


Abb. 11

Leukocytenwerte (□) und Lymphocytenwerte (■) im peripheren Blut von Spendertieren der Versuchsgruppen A, B und D.

Am Transplantationstag wurden in den Versuchsreihen A, B und D die absoluten Lymphocytenzahlen aller Spendertiere bestimmt (s. Abb. 11). In allen 3 Versuchen verminderte die ALS Behandlung die Lymphocytenwerte deutlich. Die Lymphocytenzahlen der Thymektomie und ALS Gruppe lagen etwas höher als die der ALS Tiere. Einen besonders starken Lymphocytenabfall nach ALS Gabe zeigte der Versuch D. Nach ALS Behandlung sank die Lymphocytenzahl von 11000 /mm<sup>3</sup> auf etwa 2500 /mm<sup>3</sup>. Die Lymphocytenwerte der Versuche A und B zeigten in allen Gruppen einen entsprechenden Verlauf.

Versuch A (s. Abb. 12 und Tab. 2: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>)

Unbehandeltes Spenderknochenmark erzeugte in den letal bestrahlten Tieren eine mäßig ausgeprägte Sekundärkrankheit, der 66 % der Empfänger erlagen. Die größte Mortalität lag zwischen dem 30. und 50. Tag nach Transplantation.

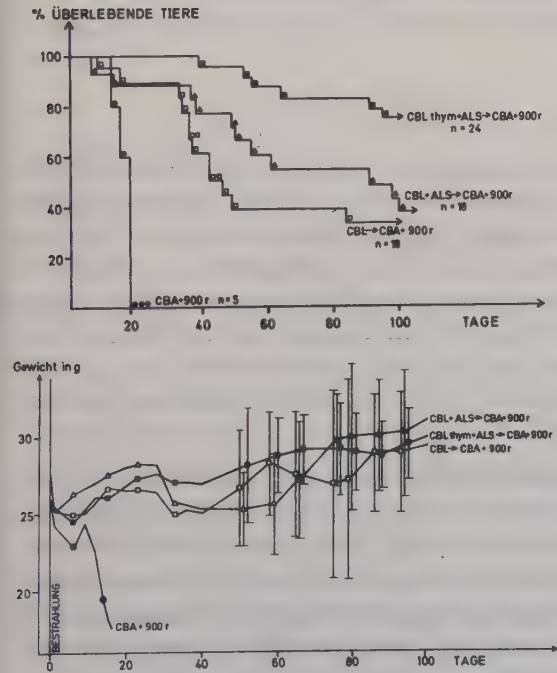


Abb. 12

Versuche A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub>  
Knochenmarktransplantation von ALS (Δ) oder ALS und Thymektomie (■) behandelten Spendern im Vergleich zu unbehandelten Spendern (□) und einer Strahlenkontrolle (●).  
Oben: Überlebenszeit in %  
Unten: Gewichtsverlauf

Die restlichen Tiere zeigten die Symptome einer schwachen GvH-Reaktion mit anfänglicher Gewichtsabnahme und leichter Diarrhoe. Unter Gewichtszunahme überlebten die Tiere die Beobachtungszeit.

Die ALS Spenderbehandlung führte zu einem verzögerten Ausbruch der Sekundärkrankheit. 11 von 18 Tieren starben an der GvH-Reaktion. 38,8 % der Empfänger überlebten den 100. Tag. ALS verbesserte die Überlebenszeit gegenüber der unbehandelten Gruppe nicht signifikant ( $p = 0,2502$ ).

Die geringste Mortalität trat in der Gruppe auf, die Knochenmark von ALS behandelten, thymektomierten Spendern erhalten hatte. 6 von 24 Empfängertieren starben bis zum 100. Tag. Alle anderen Tiere (75 % der Gruppe) überlebten die Beobachtungszeit ohne die Zeichen einer Sekundärkrankheit. Die Tiere verhielten sich unauffällig und nahmen an Gewicht zu. Die histologische Untersuchung der gestorbenen Tiere erbrachte keinen Anhalt für das Vorliegen einer chronischen GvH-Reaktion. Milz, Leber und Sternum waren normal. Der Lungenbefund sprach für eine hochgradige bakterielle Infektion, die auch als Todesursache anzusehen war. Im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe überlebten die Tiere signifikant besser ( $p \ll 0,005$ ), ebenso gegenüber der ALS Gruppe ( $p < 0,025$ ).

#### Versuch D (s. Abb. 13 und Tab. 2: $D_1$ , $D_2$ , $D_3$ )

Die unbehandelte Gruppe zeigte in diesem Versuch eine starke chronische GvH-Reaktion. 14 von 16 Tieren starben zwischen dem 33. und 67. Tag nach starker Gewichtsabnahme und Diarrhoe. Die beiden letzten Tiere starben kurz nach dem 100. Tag. ALS verbesserte die Überlebenszeit der Empfänger wie in Versuch A. Die Tiere starben während der ganzen Beobachtungszeit nach vorheriger heftiger Gewichtsabnahme. Eine gehäufte Mortalität trat zwischen dem 26. und 50. Tag sowie zwischen dem 68. und 92. Tag auf. Den 100. Tag überlebten nur 3 (20 %) der 15 Empfänger. Die ALS Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der unbehandelten Gruppe ( $p = 0,1151$ ).

Von 10 Tieren der ALS und Thymektomie Gruppe starben 3 vor dem 35. Tag. Das Vorliegen einer Sekundärkrankheit als Todesursache konnte nicht festgestellt werden. Die restlichen 7 Tiere verhielten sich völlig normal und überlebten unter ständiger Gewichtszunahme den 100. Tag. Der Verlauf der Gewichtskurven unter Berücksichtigung der Standardabweichung bestätigte ebenfalls den guten Zustand der Thymektomiegruppe. Obwohl sich nach dem für die Auswertung des Versuchs wahrscheinlich nicht brauchbaren U-Test (s. Diskussion) keine Sig-

nifikanz gegenüber der ALS Gruppe ( $p = 0,1442$ ) und der unbehandelten Gruppe ( $p = 0,1834$ ) ergab, war der Unterschied, gemessen an Mortalität, Gewichtsverlauf und am Verhalten der Tiere doch sehr deutlich.

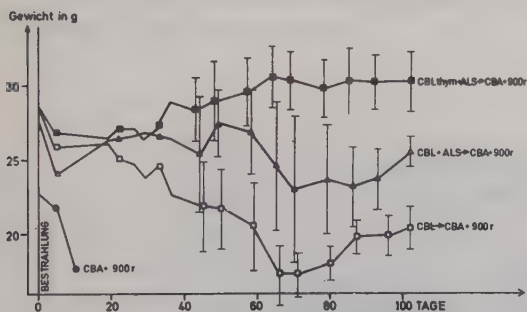
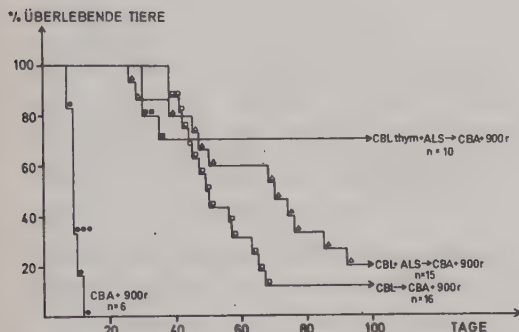


Abb. 13

Versuche  $D_1$ ,  $D_2$  und  $D_3$

Knochenmarktransplantation von ALS ( $\Delta$ ) oder ALS und Thymektomie ( $\blacksquare$ ) behandelten Spendern im Vergleich zu unbehandelten Spendern ( $\square$ ) und einer Strahlenkontrolle ( $\bullet$ ).  
Oben: Überlebenszeit in %  
Unten: Gewichtsverlauf

### Versuch B (s. Abb. 14 und Tab. 2; $B_1$ , $B_2$ und $B_3$ )

Die auffällige Verbesserung der Überlebenszeiten nach Spenderthymektomie und ALS Behandlung in den Versuchen A und D konnte in Versuch B nicht ganz bestätigt werden.

Die unbehandelte Gruppe erlag der chronischen GvH-Reaktion nach starker Gewichtsabnahme zwischen dem 27. und 69. Tag. Nach ALS Behandlung der Spender überlebten 5 (27,7 %) von 18 Tieren die Beobachtungszeit. Wiederum war die Mortalität gleichmäßig verteilt. Zwischen diesen beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0734$ ).

Die Thymektomie und ALS Gruppe verhielt sich zwar günstiger als die ALS Gruppe, die Mortalität betrug jedoch 55 %. Als Todesursache konnte eine chronische Sekundärkrankheit festgestellt werden. Zur ALS Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,2005$ ), wohl jedoch zur unbehandelten Gruppe ( $p < 0,025$ ). Die Kombination von ALS und Thymektomie führte in diesem Versuch zwar zu einem besseren Überleben der Tiere, konnte die Sekundärkrankheit aber nicht verhindern. In den Versuchen A und B wurde der gleiche ALS Pool verwendet. Die cytopenische Wirkung des Pools war in beiden Versuchsreihen sehr ähnlich. Zwischen beiden Versuchsreihen lag ein Zeitraum von 4 Monaten. Aus technischen Gründen mußte das ALS mehrmals aufgetaut werden, so daß ein Verlust an immunsuppressiver Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann.

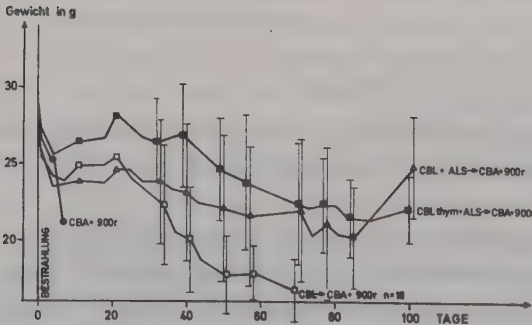
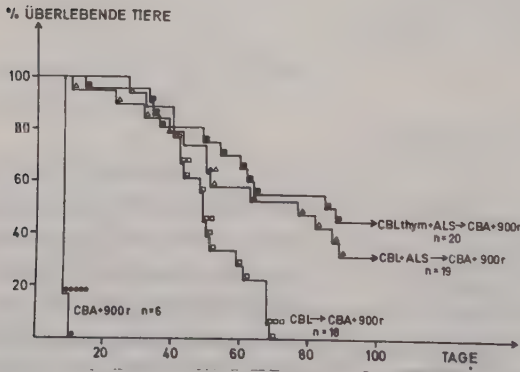


Abb. 14

Versuche B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub>  
Knochenmarktransplantation von ALS (Δ) oder ALS und Thymektomie (■) behandelten Spendern im Vergleich zu unbehandelten Spendern (□) und einer Strahlenkontrolle (●).  
Oben: Überlebenszeit in %  
Unten: Gewichtsverlauf

### 3. Immunologisches Verhalten der Knochenmarkempfänger in den Versuchen A und D

Die Transplantation von Knochenmark auf einen bestrahlten Empfänger führt zu einem Ersatz der empfängereigenen Zellen durch Spenderzellen. Dieser Schimärismus kann vollständig oder teilweise ausgebildet sein. Ein partieller Schimärismus liegt dann vor, wenn einige Empfängerzellen die Strahlenschäden überleben, und so zwei genetisch differente Zellpopulationen im Empfänger Knochenmark vertreten sind. Verdrängen die empfängereigenen Zellen die Spenderzellen, so spricht man von Schimärenumkehr oder Reversal (24). Ein Reversal kommt dadurch zum Ausdruck, daß z.B. ein Hauttransplantat des Knochenmarkspenders normal abgestoßen wird. Bei einem partiellen oder totalen Schimärismus wird die Haut des Knochenmarkspenders spezifisch toleriert, während ein Fremdtransplantat abgestoßen wird.

Es wurde untersucht, ob die Empfängertiere gegen Hauttransplantate des Knochenmarkspenders spezifisch tolerant waren, ob ein Reversal vorlag oder ob die Empfängertiere durch die immunsuppressive Spendervorbehandlung so immuninkompetent geworden waren, daß sie nicht mehr gegen zelluläre Fremdantigene reagieren konnten.

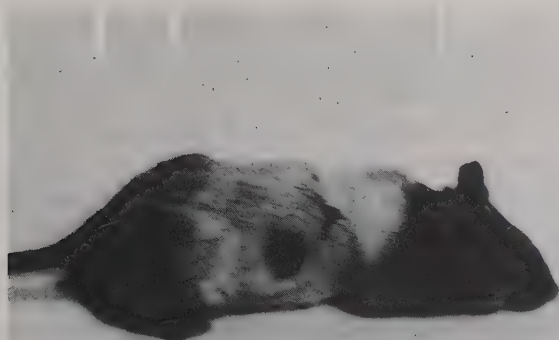


Abb. 15

Am 100. Tag nach Knochenmarktransplantation von CBL Spendern erhielten die CBA Empfänger CBL Haut übertragen. Die Hauttransplantate wuchsen üppig und zeigten bei allen Tieren keine Zeichen einer Abstoßung. Am 130. Tag wurde ein allogenes, zu beiden Stämmen stark H-2 inkompatibles A/J Hautstück transplantiert. Alle Mäuse stießen dieses Hauttransplantat normal ab, während die CBL Haut weiter toleriert wurde (s. Abb. 15).

Dieser Versuch zeigte, daß alle Empfängertiere zumindest Teilschimären waren. Darüber hinaus waren alle Tiere in der Lage, die A/J Haut abzustößen. Empfängertiere, die Knochenmark von thymektomierten, ALS behandelten Spendern erhalten hatten, zeigten eine normale Immunreaktivität gegenüber einem zellulären Antigen, sie erwiesen sich somit gegenüber den Geweben des Knochenmarkspenderstammes als spezifisch tolerant.

## Diskussion

### I. Immunkompetente Zellen im Knochenmark

Die Transplantation hämopoetischer Zellen auf letal vorbestrahlte Empfänger verhindert das tödlich verlaufende Knochenmarksyndrom als Folge des Strahlenschadens. Eine Ganzkörperbestrahlung bis zu einer Dosis von 1200r zerstört spezifisch das blutbildende System. Der dadurch geschaffene Raum bietet die Voraussetzung für das Anwachsen und die Proliferation der Spenderzellen. Der Umfang der Wiederbesiedlung ist abhängig von der Art der transplantierten Zellen. Die umfassendste Rekonstitution tritt nach Gabe von Milz- und Knochenmarkzellen ein. Diese besiedeln alle hämopoetischen Organe einschließlich des Thymus (Miller, 25). Die Milz enthält bei Nagern einen hohen Prozentsatz hämopoetischer Zellen. Lymphknotenzellen können den Thymus nicht repopularisieren.

Das Verhalten der Knochenmarkschimären richtet sich nach der genetischen Herkunft der Blutzellen. Die Transplantation syngener Spenderzellen ermöglicht eine komplikationslose Wiederherstellung des blutbildenden Systems im Empfängertier. Allogene Blutzellen verursachen im Empfänger eine Sekundärkrankheit, an der die Tiere zu Grunde gehen können.

Die Stärke der Sekundärkrankheit wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Je größer die genetischen Gewebsunterschiede zwischen Spender und Empfänger sind, um so ausgeprägter verläuft die Sekundärkrankheit. Neben der Höhe der Strahlendosis richtet sich der Verlauf der Sekundärkrankheit nach Zahl und Herkunft der transplantierten Zellen. Milzzellen bewirken einen akuten Verlauf, Knochenmarkzellen die chronische Form der Krankheit.

Die Genese der Sekundärkrankheit konnte an Hand verschiedener Versuchsmodelle geklärt werden (26). Es handelt sich dabei um eine immunologische Reaktion der Spenderzellen gegen die Gewebsantigene des Empfängerorganismus. Die Hypothese, es handelte sich um eine immunologische Abwehrreaktion von Seiten des Zellempfängers, wurde nicht bestätigt. Einen eleganten Nachweis entwickelte van Bekkum (27). In Zellübertragungsversuchen wurden Milzzellen allogener Knochenmarkschimären auf neugeborene Tiere transplantiert. Cytologisch waren in den Knochenmarkschimären nur Spenderzellen nachweisbar. Die neugeborenen Tiere repräsentierten genetisch den Empfängeranteil der Shimären. Die neugeborenen, immunologisch inkompetenten Tiere starben an den Folgen einer Runt Disease, die nur durch den Spenderanteil der Shimären verursacht sein konnte. Das Versuchsergebnis zeigte, daß die Sekundärkrankheit Ausdruck einer GvH-Reaktion ist.

Nach Transplantation allogener Knochenmarkzellen kommt es zu einer chronischen Sekundärkrankheit. In dem transplantierten Knochenmark müssen Zellen vorhanden sein, die im Empfänger zu immunkompetenten Zellen reifen können.

Die Beobachtung von Miller (13), daß sich neonatal thymektomierte Mäuse (Thymusentfernung innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt) in immunologischer Hinsicht wesentlich von nichtthymektomierten Kontrolltieren unterschieden, ermöglichte eine Untersuchung der Frage, ob das Knochenmark immunkompetente Zellen enthält, oder ob die Knochenmarkzellen über den Empfängerthymus immunkompetent geschaltet werden. Nach Transplantation syngener Milz - oder Lymphknotenzellen war die immunologische Reaktivität der neonatal thymektomierten Tiere wieder normalisiert. Nur wenige Tiere zeigten die Symptomatik einer Wasting Disease. Knochenmarkzellen konnten den Immunapparat der Tiere weniger gut rekonstituieren (28).

Sehr viel genauere Differenzierungsmöglichkeiten bietet die Methode, die von Miller et al. (14) und Tyan und Cole (29) erarbeitet wurde. Hierbei werden Transplantationsversuche an erwachsenen, thymektomierten Tieren durchgeführt. Wurden thymektomierte, syngene Knochenmarkschimären mit nichtthymektomierten Kontrolltieren verglichen, so ergaben sich im immunologischen Verhalten deutliche Unterschiede. Syngene, nichtthymektomierte Knochenmarkschimären zeigten völlig normale Immunreaktionen. Syngene, thymektomierte Knochenmarkschimären wurden auf ihre Reaktion gegenüber zellulären Antigenen untersucht. Die meisten Autoren verwendeten das Mäusesystem CBA  $\rightarrow$  CBA. Die zelluläre Immunreaktion gegen Schafererythrocyten war bei diesen Schimären permanent geschwächt. Allogene AKB oder C<sub>3</sub>H Haut, die sich vom Empfänger nicht im H-2 Locus unterscheidet und schwach inkompatibel ist, wurde konstant getragen.

Gegenüber H-2 inkompatiblen allogenen oder heterologen Hauttransplantaten wird das Verhalten der syngenen Knochenmarkschimären unterschiedlich beurteilt. Die Ergebnisse lassen sich vergleichen, da die Autoren fast identische Versuchsschemata verwendeten. Die CBA Mäuse wurden zwischen der 8. und 10. Lebenswoche thymektomiert. Am 28. oder 30. Tag nach letaler Ganzkörperbestrahlung mit einer Strahlendosis von 800 bis 1000 r wurde allogene Haut (meist von CBL Mäusen) transplantiert. Die letal bestrahlten CBA Empfänger-tiere erhielten  $4 - 5 \cdot 10^6$  CBA Knochenmarkzellen. Nach Cross et al. (30) sowie Miller et al. (31) ist das immunologische Verhalten der thymektomierten Schimären gegenüber allogener Haut nicht einmal durch Erhöhung der Zell-

zahl beeinflussbar. Von 24 thymektomierten CBA Tieren, die  $5 \cdot 10^6$  syngene Knochenmarkzellen erhalten hatten, stießen 7 Mäuse die Haut bis zum 100. Tag ab. Die Erhöhung der Zellzahl auf  $40 \cdot 10^6$  bewirkte, daß von 11 Tieren 5 Mäuse die CBL Haut länger als bis zum 70. Tag trugen. Im Vergleich zu nichtthymektomierten Kontrolltieren war die Überlebenszeit der Hauttransplantate stark verlängert. Miller schloß daraus, daß im Knochenmark keine immunkompetenten Zellen enthalten sind.

Barnes und Loutit (32) konnten die Ergebnisse von Miller nicht bestätigen. Den bestrahlten, thymektomierten CBA Tieren wurden  $3 \cdot 10^6$  syngene Knochenmarkzellen transplantiert. Von 11 Empfängern trug nur 1 Maus die CBL Haut länger als 70 Tage. Aisenberg's Resultate (33) unterstützen die Befunde von Barnes und Loutit. Alle thymektomierten CBA Schimären ( $4-5 \cdot 10^6$  syngene Knochenmarkzellen) stießen ein CBL Hauttransplantat bis zum 100. Tag ab ( $n = 31$ ). Bei syngenen, thymektomierten CBL Schimären konnte Aisenberg überhaupt keine Verzögerung in der Abstoßungszeit für H-2 inkompatible CBA Haut erzielen. Wie in einer nichtthymektomierten Kontrollgruppe wurde die Haut bis zum 17. Tag abgestoßen. Goedbloed und Vos (34) konnten an syngenen, thymektomierten (CBA/RF)  $F_1$  Schimären zeigen, daß die Abstoßung H-2 inkompatibler D 57 Haut von der Zahl der transplantierten Zellen abhängig war. Nach Gabe von  $0,5 \cdot 10^6$  Knochenmarkzellen trugen 7 von 9 Tieren die D 57 Haut länger als 50 Tage. Nach Transplantation von  $10 \cdot 10^6$  Zellen wurde die Haut bis zum 50. Tag abgestoßen. Tyan und Cole (29) stellten fest, daß thymektomierte CBA Schimären heterologe Rattenhaut normal abstießen (bis zum 20. Tag), während allogene Haut länger getragen wurde.

Diese Versuche an thymektomierten, syngenen Knochenmarkschimären zeigen, daß gegenüber stark inkompatiblen zellulären Gewebsantigenen eine immunologische Restaktivität vorhanden sein muß, die in Abwesenheit des empfängereigenen Thymus schließlich zur Transplantatabstoßung führt. Dabei fällt auf, daß die Immunreaktivität zwischen den Tierstämmen einer Spezies unterschiedlich ist. Aisenberg's Versuche an CBL Tieren lassen vermuten, daß dieser Stamm gegenüber stark inkompatiblen Antigenen seine normale Immunreaktivität beibehält. Der CBA Stamm enthält dagegen nur wenige immunkompetente Zellen im Knochenmark.

Können Knochenmarkzellen in einem allogenen, thymektomierten Empfänger eine Sekundärkrankheit initiieren? Die Versuche von Miller (31) lassen erwarten, daß die Entstehung einer GVH-Reaktion zumindest stark verzögert ist. Van Putten (35) konnte Millers Hypothese im heterologen System (Rattenknochenmark auf thymektomierte CBA Mäuse) bestätigen. Gegenüber einer nichtthymektomierten Kontrollgruppe trat die Sekundärkrankheit signifikant verzögert auf.

In dem Parental auf  $F_1$  System beobachtete van Putten eine sekundäre Mortalität nach dem 100. Tag. Eine Aussage über die Vermeidung der Sekundärkrankheit konnte der Autor nicht machen, da in der nichtthymektomierten Kontrollgruppe keine Mortalität auftrat. In Versuchen von Goedbloed und Vos (36) sowie Simmons et al. (15) im allogenen System (CBL Knochenmark auf thymektomierte CBA Tiere) konnte die GvH-Reaktion weder verhindert noch verzögert werden. Bei Goedbloed starben nach Transplantation von  $10 \cdot 10^6$  Knochenmarkzellen 84 % der thymektomierten Empfänger bis zum 100. Tag. Im gleichen Zeitraum starben 94 % der nichtthymektomierten Kontrollgruppe. Das Ergebnis wurde in den Versuchen von Simmons bestätigt.

In unseren Versuchen ( $A_1, A_5$  bzw.  $B_1, B_5$ ) konnte nach Gabe von etwa  $25 \cdot 10^6$  CBL Knochenmarkzellen ebenfalls keine Milderung oder Verzögerung der chronischen GvH-Reaktion festgestellt werden. In Versuch  $A_5$  starben die thymektomierten CBA-Empfänger sogar früher als die nichtthymektomierten Tiere der Kontrollgruppe  $A_1$ .

Syngene, thymektomierte Knochenmarkschimären reagieren gegen stark inkompatible Transplantantantigene mit einer sehr verspätet einsetzenden und verzögert ablaufenden Immunreaktion. Thymektomierte Empfänger, die allogenes Knochenmark erhalten haben, erliegen der Sekundärkrankheit ebenso schnell wie die Kontrolltiere. In beiden Fällen werden die Immunreaktionen durch das transplantierte Knochenmark ausgeführt. Es ist möglich, daß ein allogenes Hauttransplantat für die in einem syngen System proliferierenden Knochenmarkzellen einen zu geringen Antigenreiz darstellt. Die Immunantwort bildet sich spät aus und läuft verzögert ab. Transplantiert man Knochenmark auf einen H-2 inkompatiblen Empfänger, so werden die Zellen einer Umgebung ausgesetzt, in der alle Gewebsstrukturen ein stärkstes zelluläres Antigen darstellen. In diesem Antigenüberschuß werden immunkompetente Spenderzellen stark stimuliert (37).

Gibt es im Knochenmark immunkompetente Zellen? Das Knochenmark enthält zu 20 % kleine Lymphocyten (30). Diese Lymphocyten verhalten sich immunologisch anders als die kleinen thymusabhängigen Lymphocyten im zirkulierenden Blut. Nach Mitchell u. Miller (38) sind die Knochenmarklymphocyten antikörperproduzierende Zellen, während die zirkulierenden, thymusabhängigen Lymphocyten der antigenreaktiven Zellklasse angehören. Daneben enthält das Knochenmark Vorläufer- oder Stammzellen, die einen bestrahlten Thymus besiedeln können (39). Order und Waksman (40) konnten im Rattensystem nachweisen, daß diese Zellen im Thymus spezifisch verändert werden. Andererseits übt der Thymus durch aktive Entsendung von Zellen (41) oder über einen humoralen Faktor (42) einen Einfluß auf Knochenmarklymphocyten aus.

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse kann geschlossen werden, daß im adulten Knochenmark zum Zeitpunkt der Transplantation potentiell immunkompetente Zellen oder Vorläuferzellen enthalten sind. Diese Zellen können auch in einem bestrahlten, thymektomierten Empfänger immunologische Reaktionen ausführen.

Um welche Zellpopulation könnte es sich dabei handeln?

1. Kontamination mit zirkulierenden antigenreaktiven Lymphocyten.
2. Thymusunabhängige immunkompetente Zellpopulation im Knochenmark.
3. Thymusabhängige Stammzellpopulationen, die in Abwesenheit des Thymus langsamer proliferieren.

Eine Spendervorbehandlung mit immunsuppressiven Mitteln besitzt aus diesen Gründen durchaus ihre Berechtigung.

## II Immunsuppression der Knochenmarkspender und -empfänger mit ALS und Thymektomie

Die zellulären Immunreaktionen können durch ALS gehemmt werden. So ist die Primärantwort gegen Schaferythrocyten nach ALS Gabe stark erniedrigt (12, 43). Die Abstoßung allogener oder heterologer Hauttransplantate ist nach ALS Behandlung ebenfalls verzögert, die "Second Set"-Reaktion vermindert. Darüber hinaus besitzt ALS eine cytotoxische Wirkung gegenüber Lymphocyten. ALS greift vor allem thymusabhängige, kleine Lymphocyten an (12,43,44). Nach Turk und Willoughby (45) entleert ALS die lymphocytenhaltigen, periarteriolen Bezirke der Milzfollikel und die cortikalen Randzonen der Lymphknoten. Die ALS empfindlichen Areale in Milz und Lymphknoten werden ausschließlich von thymusabhängigen Lymphocyten besiedelt (46). Martin und Miller (43) wiesen nach, daß ALS auf die antigenerkennende Zellpopulation wirkt und die antikörperproduzierenden Zellen weitgehend unbeeinflusst läßt. Die immunologische Wirksamkeit von ALS ist von verschiedenen Faktoren abhängig.

1. Je nach Art der ALS-Präparation schwankt die immunologische Wirkungsbreite. Im Mäusesystem wird meistens heterologes Kaninchenantimäuselyphocytenserum verwendet, da sich mit diesem Serum eine sehr gute Immunsuppression erzielen läßt.
2. Grad und Dauer der Immunsuppression richten sich vor allem nach der Gesamtmenge und Applikationszeit des benützten Serums. Je länger ALS gegeben wird, umso eingreifender ist seine Wirkung (47). Eine Dauerbehandlung mit hohen Dosen von ALS resultiert bei Mäusen in einer so starken Schwächung des immunologischen Apparates, daß die Tiere an einer Wasting Disease zu

Gründe gehen (47). Das von uns angewandte Applikationsschema einer 6 Tage langen ALS Behandlung (Gesamtmenge 1,5 ml) ermöglicht eine ausreichende Immunsuppression der Tiere.

3. Wichtig ist der Zeitpunkt der ALS Applikation. Wird ALS vor oder gleichzeitig mit einem zellulären Antigen gegeben, so ist die Antikörperbildung gegen das Antigen verzögert. Erfolgt die ALS Behandlung erst nach der Antigengabe (z.B. am 3. Tag), so wird die Immunreaktion z.B. gegen Schaferythrocyten nur unwesentlich beeinflusst (43). In unseren Versuchen wurde ALS immer vor einer weiteren Behandlung gegeben.

Die Entfernung des Thymus vor der ALS Behandlung ermöglicht eine starke und lang andauernde Immunsuppression (12,44,47). Der nach ALS erniedrigte immunkompetente Zellpool wird durch den Thymus wieder regeneriert. Fehlt der Thymus, dann ist die Bildung neuer, immunkompetenter Zellen sehr gering. Die Zahl der vorhandenen immunkompetenten Zellen nimmt ständig ab und kann durch ALS stärkstens vermindert werden.

Die Tierstämme CBL und CBA zeigten bei gleicher Vorbehandlung (Thymektomie und ALS) gegenüber allogenen Transplantatantigenen ein unterschiedliches immunologisches Verhalten. Thymektomierte, ALS behandelte CBL Mäuse stießen ein CBA Hauttransplantat zwischen dem 30. und 50. Tag ab. Dieser Grad der Immunsuppression wurde bei CBA Tieren durch eine alleinige ALS Behandlung erreicht. Die Mäuse stießen CBL Haut ebenfalls zwischen dem 30. und 50. Tag ab. Thymektomie und ALS Vorbehandlung ermöglichte bei CBA Mäusen das Tragen von allogener CBL Haut bis weit über den 100. Tag. Die Hälfte der Tiere trug die Haut länger als 150 Tage, einige Mäuse tragen das Transplantat bereits länger als 1 Jahr.

Es gibt mehrere Erklärungen für das verschiedenartige Verhalten beider Stämme. CBL und CBA Mäuse unterscheiden sich immunologisch in ihrem H-2 Locus (CBA=H-2k; CBL=H-2b) und sind deshalb zueinander stark gewebsunverträglich. Sicher gibt es innerhalb der H-2 Histoinkompatibilitäten verschiedene Grade der Gewebsunverträglichkeit. CBL Antigene mögen beispielsweise eine schwächere Immunreaktion in CBA Tieren provozieren als umgekehrt. Aber nicht nur Antigene, auch die Immunabwehrfähigkeit kann Ursache der unterschiedlichen Hautüberlebenszeiten von CBL und CBA Tieren sein. Gegen stark inkompatible A/J Haut reagiert z.B. der CBA Stamm ebenfalls verzögert (33). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß der CBA Stamm eine geringere Zahl von zirkulierenden immunkompetenten Zellen besitzt. Eine ALS Behandlung würde den Zellbestand stärker dezimieren.

Der CBL Stamm ist dagegen sehr immunreaktiv (33,48). In diesem Stamm könnte der Pool an immunkompetenten Zellen sehr groß sein. Die histologische Untersuchung von thymektomierten und ALS behandelten CBL Tieren, welche die allogene CBA Haut zwischen dem 30. und 40. Tag abgestoßen hatten, ergab eine selektive Verminderung der Lymphocyten in den thymusabhängigen Arealen der Milz zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung. Es ist denkbar, daß das ALS die peripheren Lymphknoten in einer zu geringen Konzentration erreichte und die dort siedelnden immunkompetenten Lymphocyten nicht völlig eliminieren konnte. Von diesen peripheren Lymphknoten nimmt die immunologische Abwehrreaktion gegen Hauttransplantate ihren Ausgang (43). Eine zweimalige ALS Behandlung für die Dauer von jeweils 6 Tagen führte bei thymektomierten CBL Mäusen zu einem stark verlängertem Tragen von CBA Hauttransplantaten (49). Versuche von Jeebhoy an Ratten (44) zeigten ebenfalls, daß die fremde Haut um so länger getragen wurde, je größer der Zeitraum zwischen Thymektomie und ALS Behandlung war. Auf Grund des sich immer mehr reduzierenden Zellpools war die immunologische Wirksamkeit des ALS erhöht und führte zu einer gesteigerten Eliminationsrate in den peripheren Lymphknoten.

Die stark lymphopenische Wirkung von ALS (12,44) konnte auch in unseren Versuchen bestätigt werden. Die immunologische Wirksamkeit eines Pools kann durch diese Aussage nicht erfaßt werden, da die absolute Lymphocytenzahl und nicht die Zahl der kleinen Lymphocyten im peripheren Blut ermittelt wurde. Nach zusätzlicher Thymektomie bestand die absolute Lymphopenie bei den CBA und CBL Tieren länger als 4 Wochen.

Die thymusabhängigen, kleinen Lymphocyten bilden den Hauptangriffspunkt des ALS. Dieser Befund konnte in den Versuchen mit Thymektomie und ALS bestätigt werden. Verschieden beurteilt wird dagegen der Wirkungsmechanismus des Antilymphocytenserums. Nach Meinung vieler Autoren liegt die immunologische Wirksamkeit eines Serums in der gezielten cytotoxischen Zerstörung der immunkompetenten Lymphocyten (12,43,50,51,52). Die absolute Verminderung des immunkompetenten Lymphocytenpools einschließlich der Vorläuferzellen drückt sich in der Abwehrschwäche gegen zelluläre Antigene aus. Levey und Medawar (53) widersprechen dieser Ansicht. Die Autoren entwickelten eine Theorie, nach der die Wirkung des ALS auf einem "Blindfolding" oder "Coating" der Lymphocyten beruht. Dabei wird die Lymphocytenoberfläche durch Serumproteine abgedeckt, so daß die Antigenerkennung unmöglich wird. Nach einigen Zellteilungen soll die immunologische Funktionsfähigkeit der Lymphocyten wieder hergestellt sein. Diese Theorie konnte in weiterführenden Arbeiten von Levey und Medawar

(54,55) sowie von Martin und Miller (43) nicht bestätigt werden. Nach Levey und Medawar (54) wirkt ALS über eine "sterile Aktivierung" der immunkompetenten Zellen. ALS stimuliert die Zell- und Stammzellteilung der immunkompetenten Klone, die jedoch von keiner spezifischen, immunologischen Reifung begleitet ist. Woodruff (56) und Leuchare et al. (57) sehen die immunologische Wirkung des ALS nicht nur in seiner cytotoxischen Wirkung, sondern vermuten noch zusätzliche Wirkungsmechanismen. Thierfelder et al. (58) nehmen an, daß ALS sowohl über einen cytotoxischen Effekt als auch über eine "sterile Aktivierung" auf immunkompetente Zellen wirkt. In den Versuchen konnte gezeigt werden, daß nach Ausschaltung der immunogenen Komponente (Toleranzinduktion der Tiere gegenüber ALS) die cytotoxische Beeinflussung durch ALS zu einer weniger starken Immunsuppression als bei intoleranten Mäusen führte.

#### Der Einfluß von Thymektomie und ALS auf Knochenmark und Milz

Die in vitro Versuche mit ALS und Knochenmark ermöglichten einen Einblick in die unterschiedliche Beeinflussung der einzelnen hämopoetischen Zellreihen durch ALS. Nach De Meester (59) wurden auf Grund der Cytotoxizität die Erythropoese und Lymphocytopoese stark vermindert, während die Granulopoese gesteigert war.

Der Einfluß von ALS auf das hämopoetische System in vivo setzt sich aus zwei Komponenten zusammen.

1. Eine direkte Wirkung auf Zellen im Knochenmark.
2. Eine indirekte Beeinflussung der Knochenmarkzellen als reaktive Antwort des hämatopoetischen Organs auf die periphere Wirkung von ALS.

Die direkte Wirkung von ALS auf Knochenmarkzellen, insbesondere auf Lymphocyten, ist nur dann möglich, wenn das Serum in das hämopoetische Organ eindringen kann. Studien von Denman und Frenkel (60) mit radioaktiv markiertem ALS erbrachten den Nachweis, daß eine geringe Menge ALS im Knochenmark behandelte Tiere vorhanden war.

Die cytologisch und histologisch faßbaren Knochenmarkveränderungen nach ALS Behandlung lassen sich nicht ausschließlich durch einen direkten Einfluß des Serums erklären. Die auftretenden Veränderungen sind vielmehr als reaktive Antwort auf die periphere ALS Wirkung zu verstehen. Umfangreiche cytologische und histologische Untersuchungen liegen von Rodriguez-Paradisi et al. (61) über die Knochenmarkveränderungen nach ALS Gabe vor. Danach wurden die absoluten Knochenmarkzellzahlen nach ALS Gabe nur geringfügig erniedrigt (um 16 %). Der Lymphocytenanteil, der 20 % der Gesamtzellzahl des Knochenmarks ausmacht, war am stärksten vermindert (auf 5 %). Die ausgeprägte Lymphopenie

war gekoppelt mit einer Erythroblastopenie und einer Herabsetzung der Makakaryocytenzahl. Gleichzeitig bestand eine hochgradige Granulocytose. Die Milzbefunde ergaben eine Lymphopenie, eine Erythroblastocytose und eine Granulocytose.

Diese cytologischen Knochenmarkveränderungen nach ALS Behandlung wurden auch von De Meester nachgewiesen (59). Der Autor konnte ferner eine starke Empfindlichkeit der hämopoetischen Stammzellen gegenüber ALS feststellen.

Neben der cytologisch erkennbaren Stammzellverringering war der Einfluß von ALS auch mit der Methode der CFU bestimmbar. Die Transplantation von ALS behandeltem Knochenmark auf syngene, letal bestrahlte Empfänger resultierte in einer starken Verminderung der von Stammzellen gebildeten Kolonien auf der Milzoberfläche des Empfängers. Die Spenderbehandlung mit Hank'scher Lösung oder Kaninchennormalserum verringerte die Zahl der koloniebildenden Zellen nicht (59). Diese Ergebnisse von De Meester stehen im Gegensatz zu einem Versuch von Ledney (62), der nach ALS Behandlung und Knochenmarktransplantation eine Vermehrung der CFU fand. Die Abwägung dieser gegensätzlichen Befunde fällt schwer, da Ledney keine weiteren Versuchsergebnisse mitteilte. De Meester konnte seine Ergebnisse in mehreren Versuchen reproduzieren.

Die Transplantation von ALS behandelten Milzzellen führte bei Ledney (62) zu einer starken Erhöhung der CFU auf der Milzoberfläche. In unseren Versuchen wurden Mäuse des CBL Stammes mit ALS behandelt und subletal bestrahlt. Bei einer Strahlendosis von 650 r waren die CFU dieser Tiere stark vermehrt. Daneben waren die Milzen erheblich vergrößert. Die Befunde entsprechen denen von Ledney, sagen jedoch nichts über den Stammzellgehalt des Knochenmarks aus.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß ALS bei den Mäusen zu einer starken Lymphopenie und Granulocytose in Milz und Knochenmark führt, während die Erythropoese aus dem Knochenmark in die Milz verlagert wird (61). Die Gesamtzellzahl des Knochenmarks wird durch die kompensatorische Granulocytose nur geringfügig vermindert.

Der Einfluß von Thymektomie und ALS auf den Stammzellgehalt wurde in einem endogenen System an subletal bestrahlten Mäusen untersucht. Nach einer Strahlendosis von 650 r waren bei vielen Tieren die CFU durch Konfluation nicht zählbar. Nach Bestrahlung mit 750 r war die Stammzellzahl - gemessen an der Zahl der CFU - in der ALS Gruppe und bei den thymektomierten und ALS behandelten Tieren etwa gleich stark vermehrt.

Eine weitere Steigerung der Strahlendosis war nicht sinnvoll, da dann die Tiere den Folgen der Bestrahlung erlagen. Der Einfluß des Thymus auf den Stammzellgehalt in Knochenmark und Milz läßt sich an Hand des verwendeten Versuchsmodells nicht beurteilen, da die Differenzierungsmöglichkeiten zu gering sind.

### III Spendervorbehandlung mit ALS oder mit ALS und Thymektomie: Einfluß auf den Verlauf der chronischen Sekundärkrankheit bei thymektomierten Empfängern

Die akute Form der Sekundärkrankheit nach Milzzelltransplantation wird durch ALS Spenderbehandlung ganz vermieden (63). Die nach inkompatibler Knochenmarkübertragung auftretende chronische Sekundärkrankheit wird durch ALS weniger günstig beeinflusst. Während Ledney und van Bekkum (8) durch ALS Spenderbehandlung die chronische Sekundärkrankheit nur geringfügig verzögern konnten, sprechen Untersuchungen von Thierfelder für eine deutliche Beeinflussung der Sekundärkrankheit (9). Der Krankheitsbeginn ist um etwa 20 Tage verschoben. Die GvH-Reaktion läßt sich in ihrer Stärke durch ALS wenig vermindern.

Für die Initiierung der Sekundärkrankheit im allogenen System sind immunkompetente Zellen notwendig. Wie die Versuche an thymektomierten Empfängern zeigen, müssen diese Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation im Knochenmark vorhanden sein. Daneben kann es auch Stammzellen geben, die nur in Anwesenheit des Thymus zu immunkompetenten Zellen ausreifen können.

Der Einfluß von ALS auf die immunkompetenten Knochenmarkszellen wurde in Versuch A<sub>6</sub> untersucht. Die CBA Empfängertiere waren thymektomiert worden, um jeglichen Einfluß des Thymus auf die Genese immunkompetenter Zellen zu unterdrücken. Die Tiere der Gruppe A<sub>6</sub> verhielten sich bis zur 100 Tage-Grenze etwas besser als die nichtthymektomierte Kontrollgruppe A<sub>2</sub>. Die Überlebenszeit der Gruppe A<sub>6</sub> war signifikant besser als die der thymektomierten und nichtthymektomierten Empfänger, welche unbehandeltes Knochenmark erhalten hatten (A<sub>4</sub> und A<sub>1</sub>).

Ein Vergleich der Gruppen A<sub>6</sub> und A<sub>2</sub> erbrachte bis zum 100. Tag keinen großen Unterschied hinsichtlich der Stärke und des Auftretens der chronischen Sekundärkrankheit. In der thymektomierten Gruppe trat die GvH-Reaktion etwas verspätet und abgeschwächt auf. Das ALS eliminiert zwar immunkompetente Zellen und Vorläuferzellen im Knochenmark, der Spenderthymus behält jedoch seinen Einfluß auf diese Zellpopulationen bei. Diese Zellen rufen im thymektomierten Empfänger eine chronische GvH-Reaktion hervor. Ein interessanter Aspekt ergibt sich aus dem Verhalten beider Gruppen nach dem 100. Tag.

In der nichtthymektomierten Gruppe ( $A_2$ ) starben nach diesem Zeitpunkt nur vereinzelt Mäuse. Alle thymektomierten Tiere ( $A_6$ ) waren bis zum 180. Tag an den Folgen der chronischen Sekundärkrankheit und an viralen Infekten gestorben. Welche der beiden Erkrankungen zum Tode führte, konnte nicht geklärt werden. Eine sekundäre Mortalität, hervorgerufen durch den Mangel an immunkompetenten Zellen, wurde von van Putten (35) bei thymektomierten, allogenen Knochenmarkschimären beschrieben. Da durch das Fehlen des Empfängerthymus weniger neue, immunkompetente Zellen gebildet werden können, ist es möglich, daß die ablaufende chronische GvH-Reaktion zu einem Immunmangelzustand führt. Der Empfänger kann nicht mehr gegen ubiquitär vorhandene Antigene reagieren und geht an Infektionen und der leichten chronischen Sekundärkrankheit zu Grunde.

Die immunsuppressive Behandlung mit Thymektomie und ALS bewirkt eine sehr viel länger andauernde Schwächung der Immunreaktion gegen allogene Hauttransplantate, als es nach alleiniger ALS Behandlung der Fall ist. Dabei wird der thymusabhängige Lymphocytenpool sehr erniedrigt. Es stellte sich daher die Frage, ob eine Spenderthymektomie die immunsuppressive Wirkung von ALS auch auf das Knochenmark verstärkt und eine massivere Elimination immunkompetenter Zellen verursacht.

In dem Versuchssystem wurde Knochenmark von thymektomierten, ALS behandelten Spendern auf syngene (s.  $A_9$ ,  $C_4$  und  $D_5$ ) oder allogene, thymektomierte Empfänger (s.  $A_7$  und  $C_3$ ) transplantiert. Der Empfängerthymus wurde entfernt, um seinen Einfluß auf die Genese und Proliferation immunkompetenter Zellen auszuschalten. Als Parameter für die erreichte Immunsuppression diente der Zeitpunkt des Eintritts der chronischen Sekundärkrankheit. Im Vergleich zur alleinigen Spendervorbehandlung sollte in diesem Versuch die chronische Sekundärkrankheit verzögert und geschwächt ablaufen. Die Ergebnisse widersprachen den erhofften Resultaten. Die Überlebenszeiten der syngenen und allogenen Shimären waren im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren stark erniedrigt. 50 % der allogenen Empfänger ( $A_7$ ) starben bis zum 20. Tag, nur 2 Tiere überlebten den 100. Tag. Die Mortalität der syngenen Gruppe lag ebenfalls sehr hoch. Bis zum 42. Tag war die Hälfte der Empfänger gestorben. Die restlichen Tiere überlebten den 100. Tag, waren aber später in einem sehr schlechten Zustand. Die Symptome bei vielen Tieren der allogenen Gruppe erinnerten an das Knochenmarksyndrom als Folge einer letalen Bestrahlung ohne Zelltransplantation (23).

Als Todesursache der allogenen Shimären konnte weder makroskopisch noch histologisch das Vorliegen einer Sekundärkrankheit gefunden werden. Die histologischen Befunde der syngenen und allogenen Shimären waren einander

sehr ähnlich. Neben einer hochgradigen Atrophie des gesamten lymphatischen Gewebes mit excessiver Verminderung der Lymphocyten, fand sich eine Abnahme der Erythropoese und der Megakaryocytenbildung sowie eine starke Steigerung der Granulopoese. Einige Tiere hatten eine mäßig ausgeprägte Knochenmark-aplasie. Alle Tiere starben an den Folgen bakterieller und viraler Infektionen.

Bei der Beurteilung dieser hohen Mortalität müssen die Ergebnisse einiger Parallelversuche berücksichtigt werden. Wurde Knochenmark von ALS behandelten Spendern (keine Thymektomie!) auf thymektomierte Empfänger übertragen ( $A_6$ ), so war die Überlebenszeit dieser Gruppe am 100. Tag signifikant besser als bei unbehandelten Kontrollgruppen ( $A_1$  u.  $A_5$ ). Die Knochenmarktransplantation von ALS behandelten, thymektomierten Spendern auf nicht thymektomierte Empfänger ( $A_3$ ,  $B_3$ ,  $D_3$ ) führte gleichfalls zu guten Überlebenszeiten dieser Gruppen.

Die hohe Mortalität in den Versuchen mit Knochenmarktransplantation von thymektomierten, ALS behandelten Spendern auf thymektomierte Empfänger kann nur durch das Zusammentreffen mehrerer Faktoren erklärt werden.

1. Als wesentliche Todesursache ist histologisch die excessive Verminderung und Atrophie des lymphatischen Gewebes anzusehen. Die hieraus resultierende Abwehrschwäche gegen ubiquitär vorhandene Keime führt zu bakteriellen und viralen Infektionen, denen die Tiere erliegen. Nach Transplantation von ALS behandeltem Knochenmark auf thymektomierte Empfänger konnte diese hohe Mortalität nicht beobachtet werden ( $A_6$ ). Es ist bekannt, daß ALS im Knochenmark eine Verringerung der Lymphopoese und Erythropoese bewirkt (59,61). Die Spenderthymektomie könnte die ALS Wirkung verstärken. Dabei ist an eine hochgradige Verminderung der lymphatischen Vorläufer- und Stammzellen, aber auch der Erythropoese zu denken. Neben der cytotoxischen ALS Wirkung kommt ein reaktiver Erschöpfungszustand der Zellen in Betracht. Der Stammzellgehalt im ALS behandelten Knochenmark ist ausreichend, um den thymektomierten Empfänger wiederzubesiedeln und eine Sekundärkrankheit hervorzurufen. Nach zusätzlicher Spenderthymektomie ist die Proliferation der verbleibenden Stammzellen gestört.

2. Die erhebliche Lymphopenie und Erythroblastopenie nach ALS und Thymektomie konnte vom nichtthymektomierten Empfänger meist kompensiert werden ( $A_3, B_3, D_3$ ), denn die Tiere überlebten gut. Es ist denkbar, daß der erwachsene Thymus mittels eines Faktors die Proliferation lymphopoetischer, vielleicht auch erythropoetischer Stammzellen beeinflusst. Dieser Faktor könnte von dem epithe-

lialen Anteil des Thymus freigesetzt werden. Mehrere Arbeiten sprechen für das Vorhandensein eines solchen Faktors. Metcalf (64) berichtete über einen allgemeinen Lymphocytose stimulierenden Thymusfaktor. Ein humoraler, die Immunkompetenz rekonstituierender Faktor ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden (42,65).

Inwieweit der Thymus auch die Stimulation der Erythropoese beeinflusst, ist nicht geklärt. Nach Goodman et al. (66) bewirkt die Übertragung von Thymuszellen auf syngene, bestrahlte Empfänger eine Steigerung der Erythropoese. Neonatal thymektomierte Mäuse sollen eine Anämie entwickeln (67). Trainin et al. (68) zeigten in Zellübertragungsversuchen, daß neonatal thymektomierte Mäuse weniger CFU bilden können, daß aber der erythroide Anteil an den Kolonie-bildenden Zellen erhöht ist. Falls der Thymus die Stammzellproliferation über einen humoralen Faktor beeinflusst, ist zu fragen, ob der Thymus nach einer letalen Bestrahlung überhaupt einen Faktor bilden kann. Der epitheliale Thymusanteil ist nicht so strahlensensibel wie die lymphocytären Kompartimente. Nach Untersuchungen von Miller et al. (69) sowie von Davis und Cole (70) wird das epitheliale Gewebe mit steigender Strahlendosis zunehmend geschädigt, bis es bei 2000 r keine Sekretionsleistung mehr besitzt. Die von uns verwendete Strahlendosis von 900 r wirkt sich auf das Sekretionsvermögen des Thymusgewebes nur unwesentlich aus (70).

3. Die allogenen Gruppen ( $A_7$  u.  $C_3$ ) verhielten sich signifikant schlechter als die syngenen Empfängertiere ( $A_9$  u.  $D_5$ ), bei denen die frühe Mortalität nicht so gehäuft auftrat. Es ist möglich, daß stamesspezifische Unterschiede für diesen Befund verantwortlich sind. Syngene Knochemarkzellen proliferieren in einem für sie günstigen Milieu. Es sind weniger Stammzellen notwendig, um den Zellpool im Empfänger zu regenerieren. Im allogenen System können feine Strukturunterschiede oder eine genetisch bedingte, fremde Oberflächenbeschaffenheit das Anwachsen der Zellen erschweren. Um den allogenen Proliferationsraum besiedeln zu können, muß eine Mindestzahl hämopoetischer Zellen transplantiert werden. ALS und Thymektomie beeinflussen den Stammzellgehalt des Knochenmarks stärker als es das ALS allein vermag. In Abwesenheit stimulierender, thymusabhängiger Faktoren vermögen die wenigen transplantierten Zellen in dem fremden Milieu schlecht zu proliferieren. Viele Tiere sterben unter Symptomen, die dem Knochenmarksyndrom ähnlich sind. Bei dem Knochenmarksyndrom findet man keine Granulocytose.

Das Zusammenwirken aller Faktoren führt zu einer frühen Mortalität, vor allem der allogenen Empfänger. Ob in dieser Gruppe der Mangel an immunkompetenten Zellen und die damit verbundene Abwehrschwäche als Todesursache anzuschuldi-

gen ist, oder ob das Versagen der Spenderzellen, im Empfänger zu proliferieren, den Tod herbeiführte, ist schwer zu entscheiden.

Die später einsetzende Mortalität der syngen Gruppen ist zum größten Teil auf das Fehlen immunkompetenter Zellen zurückzuführen. Die Tiere zeigten neben einer excessiven Lymphopenie bakterielle und virale Infekte, die als Todesursache anzusehen sind. 50 % der syngen Empfängertiere überlebten den 100. Tag ( $A_9$ ). Nach dem 150. Tag waren die Tiere in einem armseligen Zustand und zeigten die Symptome eines allgemeinen Immundefizits. Diese starke, immunologisch bedingte Abwehrschwäche läßt sich bei Mäusen auch durch eine hochdosierte chronische ALS Behandlung erzielen (47). Nach zweimaliger ALS Behandlung der thymektomierten Knochenmarkspender ( $C_4$ ) starben von 18 syngen Schimären 17 Tiere bis zum 100. Tag. Die zweimalige ALS Behandlung (Gesamtmenge 3,0 ml) vermindert die lymphatischen Zellen noch stärker. Eine gewisse Varianz der Ergebnisse beruht ferner auf der unterschiedlichen immunologischen Wirksamkeit der verwendeten ALS Pools.

Die Knochenmarkversuche an thymektomierten Empfängern waren durchgeführt worden, um den Einfluß des Empfängerthymus auf die Genese spendereigener, immunkompetenter Zellen auszuschalten. Die hiermit erzielte Immunsuppression sollte ihren Ausdruck in der Abschwächung und Verzögerung der chronischen Sekundärkrankheit finden.

Unbehandeltes Knochenmark führte im thymektomierten wie nichtthymektomierten allogenen Empfänger zum gleichen zeitlichen Auftreten und zur gleichen Intensität der chronischen GvH-Reaktion.

Thymektomierte und normale Empfänger, denen allogenes, ALS vorbehandeltes Spenderknochenmark übertragen wurde, zeigten vor dem 100. Tag keinen großen Unterschied im Hinblick auf die Sekundärkrankheit. In der thymektomierten Gruppe trat die Krankheit etwas später auf, auch starben weniger Tiere während dieses Zeitraums. Nach dem 100. Tag starben alle thymektomierten Tiere an Infektionen und einer GvH-Reaktion, während sich alle den 100. Tag überlebenden Tiere der nichtthymektomierten Kontrollgruppe unauffällig verhielten.

Einen besonders ungünstigen Einfluß hatte die Empfängerthymektomie, wenn die Spender thymektomiert und ALS behandelt waren. Unter dieser maximalen Immunsuppression starben viele Tiere. Das Vorliegen einer Sekundärkrankheit konnte nicht festgestellt werden. Die Versuche konnten den Einfluß des Empfängerthymus auf das Auftreten der Sekundärkrankheit nur teilweise klären. Enthielt das Spenderknochenmark genügend immunkompetente Zellen (unbehandelt, ALS behandelt), dann konnte durch die Empfängerthymektomie die Reifung und

Proliferation dieser Zellen nicht verhindert werden. Nach ALS Spenderbehandlung zeigte sich jedoch mit zunehmender Versuchsdauer eine Erschöpfung des immunologischen Apparates gegen ubiquitäre Antigene. Nach maximaler Immunsuppression des Spenders mit ALS und Thymektomie führte die Empfängerthymektomie zu einem völligen Versagen der immunologischen Abwehrreaktionen.

#### IV Knochenmarktransplantation auf nichtthymektomierte Empfänger

Welchen Einfluß besitzt der Empfängerthymus, wenn der Knochenmarkspender thymektomiert und ALS behandelt ist? Um eine Antwort auf diese Frage zu finden, wurden Transplantationsversuche an nichtthymektomierten Empfängern durchgeführt. In mehreren Parallelversuchen ( $A_{1-4}$ ,  $D_{1-3}$ ,  $B_{1-3}$ ) wurden die Wirkungen verschiedener Spendervorbehandlungen verglichen.

Die Transplantation von unbehandeltem Knochenmark ergab in den Versuchen  $A_1$ ,  $B_1$  und  $D_1$  unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Stärke und des Eintritts der Sekundärkrankheit. In Versuch  $A_1$  war die Mortalität zwar hoch, doch überlebten 33 % der Empfänger die 100 Tage-Grenze. Die überlebenden Tiere hatten die Sekundärkrankheit überwunden, nahmen an Gewicht zu und verhielten sich unauffällig. In Versuch  $D_1$  überlebten 2 Tiere (12,5 %) den 100. Tag. Der Zustand dieser Tiere war so schlecht, daß sie bald darauf starben. Eine besonders starke Sekundärkrankheit trat in Versuch  $B_1$  auf. Alle Tiere starben bis zum 69. Tag. Die Varianz der Ergebnisse läßt zwischen den einzelnen Versuchsreihen nur einen groben Vergleich zu. Innerhalb einer Versuchsreihe ist ein genauer Vergleich möglich, da alle Gruppen gleichen Bedingungen unterworfen waren.

Die alleinige Spenderthymektomie hatte keinerlei Einfluß auf das immunologische Verhalten der Spendertiere. Der Verlauf der chronischen Sekundärkrankheit war bei den Knochenmarkempfängern von thymektomierten Spendern ( $A_4$  und  $B_4$ ) und normalen Spendern ( $A_1$  und  $B_1$ ) völlig übereinstimmend. Das Ergebnis ist verständlich, da durch eine alleinige Thymektomie der Pool an immunkompetenten Zellen erst nach Monaten verringert wird (67). Das dreiwöchige Intervall zwischen Spenderthymektomie und Zelltransplantation war nicht ausreichend, um einen Effekt auf die immunkompetenten Zellen zu erzielen.

Eine ALS Spendervorbehandlung verbesserte in allen Versuchsgruppen ( $A_2, D_2, B_2$ ) die Überlebenszeit der Empfänger deutlich. Der Krankheitsbeginn setzte verzögert ein, die Mortalität war nicht so häufig und über den ganzen Beobachtungszeitraum verteilt. Nach dem 100. Tag starben kaum mehr Tiere. Die gute immunsuppressive Wirkung von ALS auf das Knochenmark konnte bestätigt werden.

Besonders gute Ergebnisse wurden mit Knochenmarkübertragungen erzielt, bei denen der Spender thymektomiert und mit ALS behandelt worden war. In den Grup-

pen  $A_3$  und  $D_3$  überlebten 75 % bzw. 70 % der Empfängertiere den 100. Tag. Die Mortalität nach diesem Zeitpunkt war zu vernachlässigen. Alle bis zum 100. Tag gestorbenen Tiere gaben makroskopisch und histologisch keinen Anhalt für das Vorliegen einer Sekundärkrankheit. Als Todesursache kamen vielmehr Virusinfektionen in Betracht. Die übrigen Tiere verhielten sich unauffällig und nahmen an Gewicht zu.

In der Versuchsreihe A verlief die Sekundärkrankheit insgesamt schwach. Am Ende der Beobachtungszeit befanden sich alle überlebenden Tiere der Gruppen  $A_1$ ,  $A_2$  und  $A_3$  in einem guten Zustand. Gemessen an der Überlebenszeit verhielt sich die Gruppe  $A_3$  (Thymektomie und ALS) signifikant besser als die Gruppen  $A_1$  (unbehandelt) und  $A_2$  (ALS).

In Versuch D war die Sekundärkrankheit stärker ausgeprägt. Der Gewichtsverlauf und das Befinden der Tiere war zwischen den Gruppen auch am 100. Tag unterschiedlich. Die Gruppen  $D_1$  und  $D_2$  waren während der gesamten Beobachtungszeit in einem sehr schlechten Gesundheitszustand, der vor allem auf die bei einer Sekundärkrankheit auftretende Diarrhoe zurückzuführen war. Dagegen nahmen die Tiere der Gruppe  $D_3$  (Thymektomie und ALS) gut an Gewicht zu. Die Mortalität war in dieser Gruppe auf die Zeit vor dem 30. Tag beschränkt. Während dieser Periode war die Mortalität der anderen Gruppen äußerst gering. Diese Tatsache und die geringe Zahl der Versuchstiere in Gruppe  $D_3$  ( $n = 10$ ) bedingten, daß das Versuchsergebnis gegenüber den beiden anderen Gruppen ( $D_1$  und  $D_2$ ) nach dem U-Test nicht signifikant unterschiedlich war. Die Gesamtheit der Befunde (Mortalität, Auftreten der Sekundärkrankheit und Gewichtsverlauf) spricht jedoch für die gute Immunsuppression, die mit Spenderthymektomie und ALS erzielt werden kann.

Weniger erfolgreich erwies sich diese Behandlungsmethode in der Versuchsreihe B. Hier war die Sekundärkrankheit besonders stark ausgeprägt, so daß alle Tiere der Gruppe  $B_1$  (unbehandelt) starben. Von den Empfängertieren in Gruppe  $B_3$  (Thymektomie und ALS) überlebten 40 % die 100 Tage-Grenze. Zur Gruppe  $B_1$  ist das ein signifikantes Ergebnis, nicht jedoch zur Gruppe  $B_2$  (ALS). Alle Tiere der Gruppe  $B_3$  starben an den Folgen einer Sekundärkrankheit. In diesem Versuch vermochte die Spenderthymektomie die immunsuppressive Wirkung des ALS auf das Knochenmark nicht zu verstärken. Das verwendete ALS besaß eine gute immunsuppressive Wirkung, wie aus Versuch  $B_2$  ersichtlich ist. Auch die Cytotoxizität des Serums gegenüber den peripheren Lymphocyten war gut ausgeprägt. Auffallend ist, daß in dieser Versuchsreihe die Sekundärkrankheit sehr stark war und bei allen Tieren der unbehandelten Gruppe zum

Tode führte. Es ist möglich, daß der immunkompetente Zellpool dieser Spender-tiere zu groß war, um durch eine 6-tägige ALS Behandlung und zusätzlicher Thymektomie weitestgehend ausgeschaltet werden zu können.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen A und D zeigen, daß nach Spenderbehandlung mit ALS und Thymektomie die immunkompetenten Knochenmarkszellen stark eliminiert sein können. Die chronische GvH-Reaktion tritt nicht in Erscheinung. Nach Spenderthymektomie ist der Einfluß des Thymus auf die immunkompetente Zellpopulation im Knochenmark unterbrochen. Die ALS Wirkung auf die Knochenmarkszellen ist verstärkt. Das ALS kann hierbei cytotoxisch und über eine "sterile Aktivierung" wirken.

#### Immunologisches Verhalten der nichtthymektomierten Knochenmarkschimären

Ein Schimärennachweis mit cytologischen und serologischen Methoden wurde nicht vorgenommen. Es wurde untersucht, ob eine Toleranz des Knochenmarkempfängers gegen zelluläre Antigene des Knochenmarkspenders vorhanden war. Eine Toleranz gegen spendereigene Antigene tritt auf, wenn die Empfänger reine oder partielle Schimären sind, oder wenn eine hochgradige Schwächung des Immunapparates vorliegt.

Alle Überlebenden CBL → CBA Schimären der Versuchsgruppen A<sub>1-3</sub> und D<sub>1-3</sub> erhielten am 100. Tag CBL Spenderhaut übertragen. Alle Schimären trugen das üppig wachsende Hauttransplantat bis zum Ende der Beobachtungszeit (200. Tag). Um zwischen einem allgemeinen Immundefizit und einer spezifischen Toleranz gegen das Spenderantigen unterscheiden zu können, wurde den Mäusen am 130. Tag ein stark H-2 inkompatibles A/J Hautstück übertragen. Alle Mäuse stießen dieses Transplantat normal ab. Das Ergebnis spricht dafür, daß alle Überlebenden Tiere zumindest Teilschimären waren. Partielle Schimären enthalten neben- einander proliferierende spender- und empfängereigene Zellpopulationen. So lange Spenderzellen im Empfängerorganismus vorhanden sind, besitzt das Empfänger-tier eine spezifische Toleranz gegenüber Spenderantigenen.

Beachtenswert ist das Ergebnis bei den CBL → CBA Schimären, die Knochenmark von thymektomierten und ALS behandelten Spendern erhalten hatten. In diesen stark immunsupprimierten, allogenen Schimären trat keine Sekundärkrankheit auf. Die Tiere waren gegenüber CBL Haut spezifisch tolerant und reagierten normal gegen ein fremdes zelluläres Antigen.

Alle den 100. Tag Überlebenden, allogenen Schimären boten keinerlei Symptome einer chronischen GvH-Reaktion. Wie kann es bei Anwesenheit immunkompetenter Spenderzellen zu einer Toleranz der Zellen gegen den Empfängerorganismus kommen?

Der Mechanismus der Toleranzinduktion ist ungeklärt. Nach Untersuchungen von van Bekkum (37) tritt die Toleranzinduktion um so rascher ein, je geringer die Antigenunterschiede zwischen Empfänger und Spender sind. In einem H-2 inkompatiblen, allogenen System, wie es das von uns verwendete CBL → CBA System darstellt, werden nur sehr wenige Spenderzellen gegen den Empfänger tolerant. Die wenigen toleranten Klone müssen gegen die nichttoleranten immunkompetenten Spenderzellen bestehen. Nur bei wenigen Tieren bildet sich eine spezifische Toleranz gegen das Empfängerantigen aus. Van Bekkum vertritt die Ansicht, daß die Toleranz vom Empfängerthymus induziert werden kann. Arbeiten von Order und Waksman (40) sowie von Argyris (71,72) unterstützen diese Hypothese. Order und Waksman konnten im Thymus von Rattenschimären ( $F_1$  Knochenmark auf parentale Empfänger) den Ersatz von  $F_1$  Knochenmarksantigen durch parentales Antigen nachweisen. Durch Transplantation eines schwach inkompatiblen Thymus auf syngene Knochenmarkschimären konnte Argyris eine Toleranz gegenüber Thymusspenderantigenen induzieren. Dabei müssen die Schimärenzellen durch den Kontakt mit dem Spenderthymus tolerant geworden sein. Die Versuche beweisen nicht den Einfluß des Thymus auf die Entstehung einer spezifischen Toleranz, sie weisen jedoch auf eine mögliche Beteiligung des Thymus an dem Induktionsmechanismus hin. Fehlt der Empfängerthymus, dann könnte die Toleranzinduktion erschwert sein. Einen Hinweis auf diese Möglichkeit geben die Versuche  $A_2$  und  $A_6$ . ALS behandeltes Spenderknochenmark wurde auf allogene Empfänger transplantiert, die nichtthymektomiert ( $A_2$ ) oder thymektomiert ( $A_6$ ) waren. Während die Mortalität der nichtthymektomierten Gruppe nach dem 100. Tag gering war, starben alle Tiere der thymektomierten Gruppe bis zum 180. Tag. Bei diesen Tieren konnte histologisch das Vorliegen einer schwachen GvH-Reaktion festgestellt werden. In Abwesenheit des Empfängerthymus könnte die Toleranzinduktion gegen Empfängerantigene erschwert sein, wodurch es zu einer lang andauernden GvH-Reaktion mit einem sich entwickelnden Immundefizit kommt.

In dieser Arbeit wurde versucht, durch die Spenderthymektomie die Wirkung von ALS auf die Verzögerung und Schwächung der chronischen Sekundärkrankheit zu verstärken. Es konnte gezeigt werden, daß durch diese Vorbehandlung im stark H-2 inkompatiblen CBL → CBA System die Ausbildung einer Sekundärkrankheit vermieden werden kann. Wie könnte dieser Behandlungserfolg unter Berücksichtigung aller Ergebnisse erklärt werden?

Die im Knochenmark enthaltenen immunkompetenten Zellen könnten Zellklonen entstammen, die vom Thymus über einen zellulären oder (und) humoralen Mechanismus in ihrer Proliferationsfähigkeit und immunologischen Reifung beeinflusst werden. Abhängig von den Histokompatibilitätsunterschieden zwischen Spender

und Empfänger werden die Klone im allogenen System verschieden starken Proliferationsreizen ausgesetzt. Der Empfängerthymus wirkt ebenfalls stimulierend, ist jedoch keine Voraussetzung für die immunologische Reifung der Zellen. Die transplantierten, reifen, immunkompetenten Zellen initiieren eine chronische GvH-Reaktion. Die rasch proliferierenden Klone bilden neue GvH-Zellen nach. Eine Erschöpfung an immunkompetenten Spenderzellen tritt sehr langsam ein. Der Empfängerthymus induziert nur bei wenigen Spenderzellen eine spezifische Toleranz. Diese toleranten Zellklone vermögen in wenigen Fällen die intoleranten Zellen zu verdrängen. Diese Tiere überwinden die letal verlaufende Sekundärkrankheit.

Die ALS Vorbehandlung führt zu einer starken Verminderung der thymusabhängigen Lymphocyten. Der zelluläre Thymuseinfluß wird gehemmt, während die humorale Wirkung des Thymus erhalten bleibt. Durch direkte cytotoxische und immunogene ASL Wirkung auf die Knochenmarkszellen werden viele reife, immunkompetente Zellen zerstört oder gehemmt (sterile Aktivierung). Außerdem wird durch die cytotoxische Wirkung der Stammzellpool vermindert. Eine weitere Stammzellerschöpfung ist Folge einer reaktiven Knochenmarksveränderung auf Grund der peripheren ALS Wirkung. Die in ihrer Zahl verminderten und in ihrer Funktion gestörten, immunreaktiven Zellen und Klone reagieren weniger stark auf den Proliferationsreiz der Empfängerantigene und des Empfängerthymus. Die Toleranzinduktion ist dadurch erleichtert. Die chronische GvH-Reaktion ist verzögert und geschwächt. Durch die Entfernung des Empfängerthymus entsteht die Sekundärkrankheit etwas verspätet, die Toleranzinduktion ist jedoch erschwert. Die Tiere sterben an den Folgen einer GvH-Reaktion und an dem sich entwickelnden Immundefizit.

Die zusätzliche Thymektomie des Spenders verstärkt den ALS Effekt erheblich. Der Thymuseinfluß des Spenders auf die klonale Zellbildung und immunologische Reifung ist ausgeschaltet. Da die Proliferation der Klone verlangsamt ist, werden sehr viel mehr Stammzellen und immunkompetente Zellen durch das ALS eliminiert und in ihrer Funktion gehemmt. Insgesamt werden sehr wenige, unreife Zellklone transplantiert. Die Initiierung der GvH-Reaktion wird weiter vermindert, während gleichzeitig der Empfängerthymus die Toleranz gegen empfangereigene Antigene induziert. Es entwickeln sich immunkompetente Schimmären, wobei eine spezifische Toleranz der Spenderzellen gegen den Empfängerorganismus aufgetreten ist.

## Zusammenfassung

Der Einfluß einer Spenderbehandlung mit ALS und Thymektomie auf die Entstehung der chronischen Sekundärkrankheit nach Knochenmarktransplantation wurde in dem allogenen stark H-2 inkompatiblen C57BL/6 → CBA Mäusesystem untersucht. Dabei wurde auch die Bedeutung des Empfängerthymus für die Genese der chronischen Sekundärkrankheit berücksichtigt.

Die Thymektomie der CBL und CBA Mäuse erfolgte in der 9. Lebenswoche. 14 Tage danach erhielten die Tiere 6 Tage lang jeweils 0,25 ml eines heterologen Kanimchen-Antimäuselymphocytenserums. Am nächsten Tag wurde die weitere Behandlung vorgenommen. Die Knochenmarkschimären wurden bis zum 100. Tag nach Transplantation beobachtet, manchmal auch länger.

1. Die starke immunsuppressive Wirkung einer Thymektomie und ALS Behandlung konnte in dem CBL und CBA Stamm bestätigt werden. Die Überlebenszeit allogener Haut konnte bei CBL Mäusen von durchschnittlich 18 Tagen (nach ALS) auf 35 Tage verlängert werden.

Die meisten Tiere des weniger stark immunreaktiven CBA-Stammes trugen die allogene CBL Haut länger als 150 Tage. Nach alleiniger ALS Behandlung wurde die Haut durchschnittlich 38 Tage getragen.

2. Die lymphopenische Wirkung von ALS und Thymektomie war gegenüber einer alleinigen ALS Behandlung bei CBL und CBA Mäusen verlängert.
3. Der Einfluß von ALS und Thymektomie auf die Stammzellbildung wurde an subletal bestrahlten CBL Mäusen untersucht. Die Zahl der am 10. Tag nach Bestrahlung bestimmten Kolonie-bildenden Zellen auf der Milzoberfläche war gegenüber einer unbehandelten Gruppe stark erhöht. Es wurde jedoch kein großer Unterschied zur ALS behandelten Gruppe gefunden.
4. Die Transplantation von unbehandeltem Knochenmark auf letal bestrahlte, thymektomierte Empfänger war im allogenen System von einer starken Sekundärkrankheit gefolgt. Es konnte kein Unterschied zu einer nichtthymektomierten Kontrollgruppe festgestellt werden.
5. Die Knochenmarkübertragung von ALS behandelten Mäusen führte bei thymektomierten Empfängern bis zum 100. Tag zu einem etwas besseren Überleben als bei nichtthymektomierten Kontrolltieren. Bis zum 180. Tag starben alle Tiere der thymektomierten Gruppe. Die Tiere zeigten histologisch als Todesursache das Vorliegen einer Sekundärkrankheit mit viralen Superinfektionen.

6. Durch Spenderbehandlung mit ALS und Thymektomie wurden die Überlebenszeiten der thymektomierten Empfänger stark verkürzt. Die allogenen Gruppen verhielten sich signifikant schlechter als die syngenen Tiere. Als Todesursache der allogenen Schimären konnte keine Sekundärkrankheit festgestellt werden. Diskutiert wurden neben der immunologischen Abwehrschwäche der Schimären nicht immunologischbedingte Faktoren, die zu einem schlechten Proliferieren der Spenderzellen führten.
7. Die Knochenmarktransplantation von ALS behandelten, thymektomierten Spendern auf nichtthymektomierte Empfänger, ermöglichte in 2 Versuchen ein sehr gutes Überleben der Tiere, das sehr viel besser war als nach alleiniger ALS Behandlung. In den Versuchen überlebten 70 % bzw. 75 % der Empfängertiere. Die Mortalität in diesen Gruppen ließ sich nicht auf eine Sekundärkrankheit zurückführen. Alle überlebenden Empfängertiere waren gegen CBL-Spenderhaut spezifisch tolerant. A/J Haut wurde normal abgestoßen.  
In einem 3. Versuch konnte die gute Wirkung einer Thymektomie und ALS Spendervorbehandlung nicht ganz bestätigt werden. Die Sekundärkrankheit konnte in diesem Versuch nicht ausgeschaltet werden. Es bestand kein großer Unterschied zur ALS Gruppe.

Die Thymusabhängigkeit immunkompetenter Knochenmarkzellen wurde diskutiert. Dabei wurde auch die Bedeutung des Empfängerthymus für die Toleranzinduktion gegen empfängereigene Antigene besprochen.

# Literaturverzeichnis

- 1 Jacobsen L.O., Marks E.K., Robson M.J., Gaston E.O. and Zirkle R.E.: Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation, *J. Lab. Clin. Med.* 34, 1538-1543, 1949
- 2 Lorenz E., Uphoff D.E., Reid T.R. and Shelton E.: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections, *J. Nat. Cancer Inst.* 12, 197-201, 1951
- 3 Van Bekkum D.W. and de Vries M.J.: in "Radiation chimaeras", S. 28-30, Logos Press Ltd., Acad. Press. Inc. London Ltd. 1967
- 4 Mathé G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., Choay J., Trolard P., Schneider M., Hayat M., Schlumberger J.R. and Jasmin C.: Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum, *Brit. Med. J.* 2, 131-136, 1970
- 5 Prinsen G.H., van den Berg F.G., Balner H. and van Bekkum D.W.: Bone marrow transplantation of rhesus monkeys. ALS treatment of the recipient prior to transplantation, XIII. Int. Congress Hematol. Abstract. Vol. S. 405, München 1970
- 6 Cole L.J. and Maki S.E.: Differential inactivation of lymphocytes and bone marrow stem cells by heterologous anti-mouse  $\gamma$ -globulin serum, *Nature New Biol.* 230, 244-246, 1971
- 7 Dicke K.A., Lina P.H.C., van der Zwan N. and van Bekkum D.W.: Use of purified stem cell concentrates, XIII. Int. Congress Hematol. Abstract Vol. S. 405, München 1970
- 8 Ledney G.D. and van Bekkum D.W.: Secondary disease in irradiated mice grafted with allogeneic bone marrow from antilymphocyte serum-treated donors, *J. Nat. Cancer Inst.* 42, 633-641, 1969
- 9 Thierfelder S., Mempel W. und Rodriguez-Paradisi E.: Knochenmarktransplantation und Antilymphocytenserum, *Hämatologie und Bluttransfusion* 8, 198-200, 1969
- 10 Woodruff M. and Anderson N.: The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocytic serum on the survival of skin, *Nature* 200, 702, 1963
- 11 Ledney G.D. and van Bekkum D.W.: Suppression of acute secondary disease in the mouse with antilymphocyte serum, *Advance in Transplantation* S. 441-448, E. Munksgaard, Kopenhagen 1967
- 12 Monaco A.P., Wood M.L. and Russell P.S.: Adult thymectomy: Effect on recovery from immunologic depression in mice, *Science* 149, 432-435, 1965
- 13 Miller J.F.A.P.: Immunological function of the thymus, *Lancet* ii, 748-749, 1961
- 14 Miller J.F.A.P., Doak S.M.A. and Cross A.M.: Role of the thymus in recovery of the immune mechanism in the irradiated adult mouse, *Proc. Soc. Biol. Med.* 112, 785-792, 1963
- 15 Simmons R.L., Wolf S.M., Chandler J.G. and Nastuk W.L.: Effect of allogeneic bone marrow on lethally irradiated thymectomized mice, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120, 81-84, 1965
- 16 Gray J.G., Monaco A.P., Wood L.M. and Russell P.S.: Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice I. In vitro and in vivo properties, *J. Imm.* 90, 217-228, 1966
- 17 Miller J.F.A.P.: Studies on mouse leukaemia: The role of the thymus in leukaemogenesis by cell-free leukaemic filtrates, *Brit. J. Cancer* 14, 93-98, 1960
- 18 Porteous D.D. and Lajtha L.G.: On stem-cell recovery after irradiation, *Brit. J. Haemat.* 12, 177-189, 1966

- 19 Till J.E. and Mc Culloch E.A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, *Radiation Res.* 14, 213-222, 1961
- 20 Wilcoxon J., Mann H.B. and Whitney D.R.: In "Statistische Auswertungsmethoden", Sachs. L. S. 293-303, Springer Verlag Berlin 1968
- 21 Van Bekkum D.W. and de Vries M.J.: In "Radiation chimaeras S. 81-82, Logos Press Ltd., Acad. Press Inc. London Ltd. 1967
- 22 Van Bekkum D.W. and de Vries M.J.: wie 21, S. 94-108
- 23 Van Bekkum D.W. and de Vries M.J.: wie 21, S. 128-131
- 24 Van Bekkum D.W. and de Vries M.J.: wie 21, S. 40-48
- 25 Miller J.F.A.P. and Osoba D.: In "Current concepts of the immunological function of the thymus" S. 439 *Physiol. Rev.* 47, 437-520, 1967
- 26 Van Bekkum D.W. and de Vries M.J.: In "Radiation chimaeras" S. 81-92, Logos Press Ltd., Acad. Press Inc. London Ltd. 1967
- 27 Van Bekkum D.W. and de Vries M.J.: wie 26, S. 89
- 28 Miller J.F.A.P. and Osoba D.: In "Current concepts of the immunological function of the thymus" S 472 *Physiol. Rev.* 47, 437-520, 1967
- 29 Ryan M.L., Cole L.J. and Davis W.E.: Thymus: Its limited role in the recovery of homograft response in irradiated mice, *Science* 142, 584, 1963
- 30 Cross A.M., Leuchars E. and Miller J.F.A.P.: Studies on the recovery of the immune response in irradiated mice thymectomized in adult life, *J. Exp. Med.* 119, 837-850, 1964
- 31 Miller J.F.A.P., Leuchars E., Cross A.M. and Dukor P.: Immunologic role of the thymus in radiation chimeras, *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 120, 205-217, 1964
- 32 Barnes D.W.H., Loutit J.F. and Sansom J.M.: Role of the thymus in the radiation chimera, *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 120, 218-229, 1964
- 33 Aisenberg A.C.: Allogeneic thymus grafts and the restoration of immune function in irradiated thymectomized mice, *J.Exp.Med.* 131, 275-286, 1970
- 34 Goedbloed J.F. and Vos O.: The capacity for skin rejection in mice thymectomized neonatally or in adult life, *Transplantation* 3, 368-379, 1965
- 35 Van Putten L.M.: Thymectomy: Effect on secondary disease in radiation chimeras, *Science* 145, 935-936, 1964
- 36 Goedbloed J.F. and Vos O.: Influences on the incidence of secondary disease in radiation chimeras: Thymectomy and tolerance, *Transplantation* 3, 603-609, 1965
- 37 Van Bekkum D.W.: Immunological reactivity and specific tolerance of the graft in radiation chimeras and the influence of thymectomy. In *Colloque Nr. 147: La greffe des cellules hématopoïétiques allogéniques*, S. 381-390, CNRS, Paris 1964
- 38 Mitchell G.F. and Miller J.F.A.P.: Cell to cell interaction in the immune response II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes, *J. Exp. Med.* 128, 821-839, 1968
- 39 Ford C.E. and Micklem H.S.: The thymus and lymph-nodes in radiation chimeras, *Lancet* 1, 359-362, 1963
- 40 Order E.S. and Waksman B.H.: Cellular differentiation in the thymus: Changes in size, antigenic character and stem cell function of thymocytes during thymus repopulation following irradiation, *Transplantation* 8, 738-800, 1969
- 41 Weissman I.L.: Thymus cell migration, *J. Exp. Med.* 126, 291-304, 1967
- 42 Osoba D. and Miller J.F.A.P.: Evidence for a humoral thymus factor responsible for the maturation of immunological faculty, *Nature* 199, 653-655, 1963
- 43 Martin W.J. and Miller J.F.A.P.: Cell to cell interaction in the immune response IV. Site of action of antilymphocyte globulin, *J. Exp. Med.* 128, 855-874, 1968

- 44 Jeejeebhoy H.F.: Immunological studies on the rat thymectomized in adult life, *Immunology* 9, 417-425, 1965
- 45 Turk J.L. and Willoughby D.A.: Central and peripheral effects of anti-lymphocyte serum, *Lancet* 1, 249-251, 1967
- 46 Parrott D.M.V., de Sousa M.A.B. and East J.: Thymus dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice, *J. Exp. Med.* 123, 191-204, 1966
- 47 Russell P.S. and Monaco A.P.: Heterologous antilymphocyte serum: Heterologous antilymphocyte sera and some of their effects, *Transplantation* 5, 1086-1099, 1967
- 48 Hess M.W.: In "Experimental thymectomy: Possibilities and limitations", S. 48, *Exp. Med. Path. Klin.* 25, 1968
- 49 Thierfelder S.: Unveröffentlichte Beobachtung
- 50 Jeejeebhoy H.F.: The effects of heterologous anti-lymphocyte serum on lymphocytes of thymus and marrow origin, *J. Exp. Med.* 132, 963-975, 1970
- 51 Monaco A.P., Wood M.L. and Russell P.S.: Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice. III. Immunologic tolerance and chimerism produced across the H-2 locus with adult thymectomy and anti-lymphocyte serum, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 129, 190-209, 1966
- 52 Lance E.M.: The selective action of antilymphocyte serum on recirculating lymphocytes a review of the evidence and alternatives, *Clin. Exp. Immunol.* 6, 789-802, 1970
- 53 Levey R.H. and Medawar P.B.: Some experiments on the action of antilymphoid antisera, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 129, 164-177, 1966
- 54 Levey R.H. and Medawar P.B.: Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 56, 1130-1137, 1968
- 55 Levey R.H. and Medawar P.B.: Further experiments on the action of antilymphocytic antiserum, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58, 470-477, 1967
- 56 Woodruff M.F.A.: Antilymphocyte serum: Summary and further observations, *Transplantation* 5, 1127-1135, 1967
- 57 Leuchars E., Wallis V.J. and Davies A.J.S.: Mode of action for anti-lymphocyte serum, *Nature* 219, 1324-1328, 1968
- 58 Thierfelder S., Götze D. und Eulitz M.: Die Wirkung von Kaninchen-anti-Maus-Lymphocyten- $\gamma$ -Globulin auf die chronische Sekundärkrankheit bei gegen Kaninchen-Normal- $\gamma$ -Globulin-toleranten Knochenmarkspendern, *Klin. Wschr.* 48, 1464-1466, 1970
- 59 De Meester T.R., Anderson N.D. and Shaffer Ch. F.: The effect of heterologous anti-lymphocyte serum on mouse hemopoietic stem cells, *J. Exp. Med.* 127, 731-748, 1968
- 60 Denman A.M. and Frenkel E.P.: Mode of action of anti-lymphocyte globulin I. The distribution of rabbit anti-lymphocyte globulin injected into rats and mice, *Immunology* 14, 107-113, 1968
- 61 Rodriguez-Paradisi E., Thierfelder S., Götze D., Eulitz M. and Beil E.: Cytology and histology of haemopoietic cell transplantation under the influence of antilymphocyte serum (ALS) in mice. I. The in vivo effect of antilymphocytic globulin on haemopoietic tissue, *Clin. Exp. Immunol.* 8, 107-119, 1971
- 62 Ledney G.D.: Influence of antilymphocyte serum on hemopoietic proliferation in the mouse as measured by spleen weight and colony-forming unit assay, *Exp. Hematology* 14, 42-43, 1967
- 63 Van Bekkum D.W., Ledney G.D., Balner H., van Putten L.M. and de Vries M.J.: Suppression of secondary disease following foreign bone marrow grafting with antilymphocyte serum, *Ciba Foundation Study Group Nr. 29 Antilymphocyte Serum* S. 97-107, Churchill Ltd. London 1967

- 64 Metcalf D.: The thymus lymphocytosis stimulating factor, Ann. N.Y. Acad. Sci. 73, 113, 1958
- 65 Hallenbeck G.A., Kubista Th.P. and Shorter R.G.: Restoration of immunologic competence of neonatally thymec tomized mice by isogeneic and xenogeneic thymic grafts, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 1142-1146, 1969
- 66 Goodman J.W. and Shipcock S.G.: Influence of thymus cells on erythropoiesis of parental marrow in irradiated hybrid mice, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129, 417-422, 1968
- 67 Metcalf D.: In "The thymus", S. 43-50 u. 74, 75, Recent Results in Cancer Research, 5, Springer, New York, 1966
- 68 Trainin N. and Resnitzky P.: Influence of neonatal thymectomy on cloning capacity of bone marrow cells in mice, Nature 221, 1154-1155, 1969
- 69 Miller J.F.A.P., de Burgh P.M., Dukor P., Grant G., Allman V. and House, W.: Regeneration of thymus grafts. II. Effects on immunological capacity, Clin. Exp. Immunol. 1, 61-76, 1966
- 70 Davis W.E. and Cole D.J.: Retarded immunological recovery in sublethally x-irradiated mice by additional thymic exposure. Reversal with injected marrow cells, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 1336-1344, 1969
- 71 Argyris B.F.: Role of thymus in adoptive tolerance, J. Immunol. 100, 1255-1258, 1968
- 72 Argyris B.F.: Thymus-bone marrow interaction in transplantation immunity, Transplantation 8, 538-540, 1969

Herrn Priv.-Doz. Dr. S. Thierfelder möchte ich  
für die Überlassung des Themas und Herrn Prof.  
Dr. W. Stich für den Arbeitsplatz danken.

Allen Mitarbeitern der Abt. f. Immunhämatologie  
darf ich für ihre Unterstützung und für ihre  
Ratschläge danken.

Herrn Dr. E. Beil danke ich sehr für die Durch-  
führung und Beurteilung aller histologischen  
Untersuchungen.

## Lebenslauf

|             |                                                                                                                                                     |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 21.4.1945   | geboren als Sohn des Univ.-Prof.Dr.<br>Joachim Werner und seiner Gemahlin,<br>Frau Dr.phil. Traut-Christa Werner,<br>geb. Hasselbach in St. Blasien |
| 1951 - 1956 | Besuch der Volksschule in München                                                                                                                   |
| 1956 - 1966 | Oskar von Miller Gymnasium in München                                                                                                               |
| 19.7.1966   | Reifeprüfung                                                                                                                                        |
| 1966 - 1972 | Medizinstudium an der Universität<br>München                                                                                                        |
| 3.4.1969    | Ärztliche Vorprüfung                                                                                                                                |
| 26.7.1972   | Staatsexamen                                                                                                                                        |





